

В СОДЕРЖАНИЕ

Тема: **МЕТОДИКА ПОЛУЧЕНИЯ ЭМБРИОНОВ ДАНИО РЕРИО ДЛЯ ЛАБОРАТОРНЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ**

Данио – миролюбивые стайные рыбы, которые благодаря своей неприхотливости являются частыми гостями в аквариумах любителей. Это одни из немногих рыб, которые обитают у поверхности воды. Стоит отметить, что данио – разнородная по размеру группа, однако наибольшее распространение получил вид данио-рерио, а также его многочисленные вариации (данио розовый, данио вуалевый, данио глофиш). Данио считается одной из наиболее простых в разведении икромечущих рыб. Нередко нерест может происходить в общем аквариуме, правда в подобном случае не стоит надеяться на высокий процент выживших мальков.

Условия для размножения

Данио отличаются огромной плодовитостью, при создании подходящих условий они размножаются круглый год. Новое поколение мальков можно получать каждые 10-12 дней. Безусловно, если вы нацелены на максимальный результат, то разводить их придется в отдельных емкостях, так как в общих аквариумах большая часть мальков будет съедена как соседями данио, так и самими родителями, ведь забота о потомстве у данио-рерио полностью отсутствует.

Ключевой момент подготовки данио к нересту – усиленное кормление. Это заложено в природе самих рыб, ведь лучшие условия для нереста наступают тогда, когда вокруг много пищи. Если вы являетесь обладателями молодых данио, то уже через 7-10 дней плотной диеты вы обнаружите, что одни рыбы стали более округлыми – это будут самки, в теле которых начинает созревать икра.

После того, как вы определились с полом производителей, их следует рассадить в отдельные аквариумы, наполненные водой из основного аквариума и оснащенные небольшими аэрлифтными фильтрами. Усиленное кормление при этом продолжается. Не забывайте регулярно подменивать воду, чтобы данио не погибли в результате отравления продуктами своей жизнедеятельности. В таком состоянии их следует держать 7-10 дней.

Пока рыбы находятся на отдельном «карантине», следует подготовить нерестовую емкость, в которой и будет происходить процесс икрометания. Чаще всего используется аквариум объемом 20-40 литров. Укладывая на дно грунт нет необходимости. Его заменяют круглыми стеклянными шариками (диаметром около 1 см), сепараторной сеткой, искусственным нерестовым субстратом или мелколиственными растениями – яванским мхом, роголистником, элодеей и т.п. Они помогут защитить икру от поедания своими же родителями.

Из оборудования понадобится небольшой терморегулятор, который будет поддерживать комфортную температуру воды. Она должна быть на 2-3°C ниже обычной. Уровень воды в нерестовике не должен превышать 10 см.

Причем половина воды берется из основного аквариума и разбавляется таким же количеством мягкой воды с нейтральным рН.

Наконец, наступает день для объединения производителей в нерестовом аквариуме. Делать это лучше всего вечером. Очень важно, чтобы соотношение самок и самцов было 1 к 2, поскольку именно самцы помогают женским особям «выбивать» икру.

Чаще всего нерест происходит на рассвете. Самцы преследуют самок и совершают небольшие тычки им в бок, что стимулирует самок к икрометаанию. За один нерест самка данио способна отложить несколько сотен икринок. Они серые и имеют размер менее 1 мм. Рыбы не делают кладки, икра просто рассеивается по дну.

К сожалению, нерест не всегда проходит гладко. Если у вас ничего не получилось в первый раз, то рекомендуется подождать еще 48 часов. Если и по истечении этого времени данио не размножаются, тогда следует снова рассадить их по отдельным аквариумам и предпринять следующую попытку через 3-4 дня.

После завершения нереста производителей необходимо вернуть в общий аквариум, чтобы у них не возникло соблазна полакомиться собственной икрой.

Обратите внимание на то, что не все икринки будут оплодотворенными. Обычно неоплодотворенная икра быстро белеет, ее рекомендуется удалить из аквариума пинцетом. Чтобы не допустить заражения икры грибком желательно добавить в воду несколько капель метиленового синего или других противогрибковых препаратов.

Отличие самок данио от самцов

Половой диморфизм у данио выражен слабо. Молодых особей отличить по полу практически невозможно. А вот половозрелые рыбы имеют ряд косвенных отличий. Первое, на что стоит обратить внимание – это форма тела. У самок созревает икра, из-за чего их брюшко становится более округлым. Женские особи данио крупнее мужских. Самцы более вытянутые и стройные, окрашены, как правило, ярче. Наконец, отличить самца вы можете по характерным «танцам» возле самки, он пытается показать себя во всей красе, поэтому расправляет все свои плавники.

Готовность к нересту. Самый главный признак, указывающий на то, что самка данио готова к размножению – это увеличения брюшка. Оно становится крупным и округлым. Некоторые аквариумисты по неопытности иногда принимают это за симптомы заболевания желудочно-кишечного тракта.

Изменяется и поведение самки. Она становится медлительной, все чаще прячется в укрытиях или среди растений. Активность самцов, наоборот, повышается, они начинают активно преследовать спутниц.

Стоит отметить, что если не создать самкам подходящих условий для освобождения от икры, то последствия могут быть крайне печальными, вплоть до гибели самки. Ведь перезревшие икринки могут спровоцировать развитие кисты.

Во время нереста самка редко выметывает всю икру за один раз. Настоятельно рекомендуется посадить ее в нерестовую емкость с самцами еще раз по прошествии 1-2 недель, чтобы она могла полностью освободиться от икры.

В отдельных случаях рекомендуется сцеживать икру у самок самостоятельно, закутав ее в мокрую ткань и аккуратно надавливая на брюшко.

Через сколько вылупятся мальки

Инкубация икры напрямую зависит от температуры в нерестовом аквариуме. При 26-28°C икра созревает в течение 30-36 часов, при более низкой – процесс может затянуться и на неделю.

Тема: МЕТОДИКА ВЫРАЩИВАНИЯ ДАНИО РЕРИО ДЛЯ ЛАБОРАТОРНЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ

Получение личинок. После завершения инкубация на свет появляются крохотные полупрозрачные личинки, которых очень трудно различить в воде. Они ведут неподвижный образ жизни, закрепившись на подходящем субстрате, и первое время питаются за счет желточного мешка. В таком состоянии они проводят 3-4 дня, после чего начинают активно плавать по аквариуму. С этого момента малышей необходимо усиленно кормить.

Кормление мальков. Стартовым кормом для мальков данио является инфузория, но по мере роста можно переходить на качественные сухие корма для мальков. Кормят мальков 2-4 раза в сутки. В этот период очень важно следить за качеством воды в аквариуме. Мальки никогда полностью не съедают насыпаемый корм, что приводит к его загниванию. Чтобы не допустить отравления молодых рыбок, каждый день необходимо подменивать 10-20% воды в нерестовике. Параметры воды должны быть схожими. В это же время можно оснастить аквариум аэрлифтным фильтром, который позволит поддерживать биологическое равновесие.

Молодые данио-рерио растут очень быстро, поэтому мальков необходимо пересаживать в более просторные аквариумы и сортировать по размерам, чтобы избежать угнетения более слабых особей. В возрасте 5-7 недель данио обычно достигают размера около 1 см, а спустя еще 3 месяца они уже способны вырасти до 2 см. В таком размере другие мирные рыбки не представляют для мальков опасности, и их можно пересаживать в общий аквариум.

Процесс размножения протекает совершенно одинаково у любых форм данио-рерио. Существует заблуждение, что генетически модифицированные данио глофиш бесплодны, что не соответствует действительности. Изменения ДНК никак не затрагивают плодовитость рыб, в подходящих условиях они размножаются так же легко, как и обычные данио. Более того, они передают гены, отвечающие за биолюминесценцию, будущим поколениям.

В состав материально-технической базы лаборатории входит: специализированные виварии для проведения экспериментов и выращивания личи-

нок, мальков и взрослых данио рерио общим водообъемом 6000 литров; участок выращивания живых кормов и водорослей; участок получения эмбрионов и их инкубации; комплекс оборудования для нейробиологических исследований с использованием эмбрионов, личинок, мальков и взрослых данио рерио, оборудование для мониторинга показателей качества воды, а также другое оборудование для токсикологических, физиологических, биохимических и других исследований.

Для ежедневного получения эмбрионов данио рерио в лаборатории имеется половозрелое стадо данио рерио дикого типа с ведением учета их плодовитости. Рыбы содержатся с 12 часовым фотопериодом. Самки содержатся совместно с самцами, однако за 12 часов до получения эмбрионов рыбы рассаживаются раздельно по полу. В период основного выращивания, половозрелые рыбы питаются высокобелковыми коммерческими кормами Tetra, а также регулярно получают живые корма в виде гриндальского червя и аулофоруса, а также науплий артемии.

Получение эмбрионов осуществляют в специализированных нерестовых емкостях, имеющих отсек, отделяющих взрослых особей от эмбрионов, а также прозрачную перегородку, отделяющих самцов от самок перед началом нереста. Благодаря контролируемому получению эмбрионов, имеется возможность управлять эмбриональным развитием с точностью до 10 минут. После сбора и отмывания эмбрионов, они помещаются в различные емкости в зависимости от целей эксперимента: стеклянные или полистироловые чашки Петри, 96 луночные планшеты с круглыми или квадратными лунками. Инкубация эмбрионов осуществляется в термостатах при температуре – 28,0°C в течение 120 – 144 часов (5 – 6 суток) после оплодотворения.

Тема: **МЕТОДИКА ИНКУБАЦИИ АРТЕМИИ САЛИНА ДЛЯ ЛАБОРАТОРНЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ**

Artemia salina как кормовой объект. Многие водные беспозвоночные, обитающие во временных, пересыхающих, ультрагалинных водоемах или в прибрежной части крупных водоемов, обладают способностью переносить длительное высыхание, промерзание, повышение температуры за критические пределы, летальные для особей данного вида в деятельном состоянии в виде стойких покоящихся яиц. При попадании яиц в благоприятные условия существования из них выходят личинки, дающие начало новым популяциям.

Жаброногие рачки, такие как *Artemia salina*, откладывают огромное количество покоящихся яиц. При массовой откладке таких яиц в известные периоды и при определенных условиях становится возможным их сбор с целью получения мельчайшего корма для личинок рыб.

Наиболее доступными для сбора оказались покоящиеся яйца жаброногого рачка артемия салина, обитающего в ультрагалинных водоемах. Полу-

ченные из яиц науплиусы являются хорошим кормом для выращиваемых в индустриальных условиях личинок рыб.

Для выращивания более крупных личинок рыб (осетровых и лососевых) используют не только науплиусов, но и артемию на более поздних стадиях развития. Практика мирового рыбоводства убедительно показала особую ценность науплиусов артемии в качестве стартового корма для личинок рыб.

Ценность артемии как кормового объекта определяется:

- широким диапазоном размеров – может быть использована как корм для разных видов рыб на разных этапах (0,5–10 мм);

- мелкими размерами науплиев (0,5 мм) с мягким и тонким (1 мкм) наружным скелетом – позволяет использовать науплиев в первые часы и дни жизни многих видов рыб и ракообразных;

- высоким темпом роста – за две недели выращивания рачки увеличиваются в длину в 20 раз, а их сухая масса возрастает в 500 раз;

- высокой степенью использования пищи на прирост – до 50 %;

- высоким содержанием белка в теле рачка – до 60 % (на сухие массы) при значительном уровне незаменимых аминокислот, витаминов, гормонов, каротиноидов;

- способностью к интенсивному росту при очень высоких плотностях (более чем 10 000 животных на 1 л соленой воды);

- высокой плодовитостью (более чем 100 потомков за каждые четыре дня);

- уникальными адаптационными возможностями вида, позволяющими рачкам существовать в широком диапазоне солености – от солоноватых вод до перенасыщенных;

- возможностью находиться в виде инертного продукта – яиц, которые могут быть собраны в промышленных масштабах и способны сохраняться годами, а через 1–2 сут. инкубации в любое время года могут быть получены свободноплавающие науплии;

- медленным плаванием, делающим науплиев и взрослых рачков доступным кормом для потребителей;

- содержанием в теле взрослых рачков репродуктивных гормонов, стимулирующих созревание организмов – потребителей артемии.

Артемия относится к подтипу ракообразных (*Crustacea*), классу Жаброногие (*Branchiopoda*), отряду Жаброноги (*Anostraca*), семейство Артемиевые (*Artemiidae*). Известно более 50 рас артемии, различающихся по морфологическим, физиологическим и биохимическим показателям. Эти различия определяются генетической неоднородностью популяций, а также условиями окружающей среды.

Тело артемии вытянутое, хорошо сегментированное. Взрослая артемия в природных условиях достигает длины 10–15 мм и веса 10–12 мг.

Тело разделено на три отдела: грудь, голову и брюшко. На голове имеются один непарный (науплиальный) глаз и два больших сидящих на стебельках сложных глаза; антеннулы и антенны и ротовые части. Грудной от-

дел состоит из одиннадцати сегментов, на каждом из которых находится по паре листовидных ножек. Наружные придатки грудных ножек выполняют дыхательную функцию, внутренние – служат для движения и отфильтровывания пищи. Брюшко состоит из 8 сегментов и не имеет конечностей. Первые два сегмента брюшка слиты в один половой сегмент, на котором у самок находится яйцевой мешок, а у самцов – совокупительный орган. Брюшко заканчивается концевой пластинкой, от которой отходят две ветви – фурки, оперенные многочисленными щетинками.

Окраска рачков определяется характером потребленной пищи, а также концентрацией растворенного в воде кислорода и варьирует от зеленоватой до красной.

Размножение и развитие артемии

Артемии раздельнополы. Они могут размножаться половым путем и партеногенетически без участия самцов. Яйцевой мешок самок имеет округлую форму. При определенных условиях развитие яиц полностью протекает в яйцевом мешке и самки выметывают молодь на стадии науплиуса в окружающую среду. При неблагоприятных условиях самки прекращают живорождение и откладывают яйца. Одна самка может давать до 170 яиц или науплиусов за одну кладку и около 30 кладок в течение жизни. Для практического использования в рыбоводстве представляют интерес покоящиеся (диапаузирующие) яйца артемии.

Существуют партеногенетические и двуполые особи артемии соответственно с яйцеживородящим и яйцекладущим видами репродукции. Из цист вылупливается яйцеживородящее потомство; яйца сохраняются внутри матки до полного завершения эмбрионального развития. В экстремальных условиях эмбрионы развиваются только до стадии гастролы. После чего у яиц (размер 200–300 мкм) образуется толстая оболочка и они переходят в состояние покоя или спячки (диапаузы) с соответствующим метаболизмом, и самка (яйценосная) выводит их из своего тела.

В определенные периоды года огромные количества яиц артемии плавают на поверхности соленых озер и сносятся ветрами и волнами к берегу. Яйца остаются в диапаузе до тех пор, пока находятся в сухом (высушены на воздухе или обезвожены за счет пребывания в условиях повышенной солености) или анаэробном состоянии. Диаметр диапаузирующих яиц в среднем равен 0,2 мм, масса сырого яйца – 0,04 мг, сухого – 0,02 мг, причем 30 % массы сырого яйца приходится на оболочку. Находящиеся в покоящихся яйцах эмбрионы могут переносить неблагоприятные внешние условия. Они выдерживают значительное высыхание и могут находиться в сухом состоянии в течение нескольких лет. Благодаря высокой стойкости диапаузирующих яиц, вид переносит осолонение, опреснение, промерзание, воздействие высоких температур и расселяется из одного водоема в другой.

После периода диапаузы при благоприятной температуре, высоком содержании в воде кислорода и прочих оптимальных условиях в яйце продолжается развитие эмбриона, которое завершается в течение 24–48 ч, после чего оболочка разрывается и науплиусы выходят во внешнюю среду. При вы-

ходе из яйца науплии имеют длину 0,45 мм, сырая их масса равна 0,01 мг. Науплий имеет коричневатую-оранжевую окраску благодаря присутствию желтка, у него три пары конечностей: антенны, выполняющие двигательные и сенсорные функции, и рудиментарные мандибулы.

Личинка растет и проходит 15 линек: туловище и брюшко начинают удлиняться, функционирует кишечный тракт, парные отростки превращаются в грудные ножки и смещаются в область туловища, начинается развитие боковых сложных глаз. Начиная с десятой стадии наблюдаются важные морфологические изменения: антенны теряют первичную двигательную функцию. У будущих самцов они превращаются в специальные крючкообразные хватательные органы, а у самок – в короткие листообразные отростки. Грудные ножки делятся на три функциональные группы: телоподиты, действующие как фильтра-торы, веслоподобные эндоподиты, обеспечивающие локомотивную активность, и мембранные экзоподиты, функционирующие как жабры.

Самки имеют парные яичники, располагающиеся по обеим сторонам кишечного тракта позади грудных ножек.

Созревшие ооциты поступают из яичника в непарную матку, находящуюся внутри яйцевого мешка. В нее же открываются протоки скорлуповых желез, из секрета которых образуется наружная оболочка яиц.

После копуляции оплодотворенное яйцо развивается в свободноплавающий науплий (живорождение) или, когда достигает стадии гастролы, окружается толстой оболочкой и откладывается как циста, находящаяся в диапаузе (яйценошение). Чередование живорождения и яйценошения может происходить несколько раз в течение жизни самки. Переход от живорождения к яйценошению происходит при повышении солености и снижении содержания кислорода в среде.

В случае пересыхания водоема яйца из состояния диапаузы могут перейти в стадию покоя, в которой могут находиться несколько лет. При попадании в воду они способны к дальнейшему развитию.

По способу питания артемия является фильтратором. Науплии для этой цели пользуются щетинками антенн, взрослые – всеми грудными ножками. Избирательность в отношении качества корма не обнаружена. Питается артемия одноклеточными водорослями, бактериями, простейшими. Количество отфильтрованной пищи зависит от размера рачков. По мере увеличения концентрации пищи количество отфильтрованного материала увеличивается, но до определенного предела. С увеличением концентрации пищи скорость фильтрации замедляется.

Длительность жизни рачков составляет несколько месяцев, плодовитость – до 100 науплиев или яиц каждые 3–7 дней.

Влияние факторов среды на развитие науплиусов

О чрезвычайной пластичности артемии свидетельствует ее отношение к факторам внешней среды.

Артемия обитает в хлоридных, сульфатных и карбонатных водах, соленость их достигает 300‰. Но некоторое время она может жить даже в пре-

сной воде (не более 1 ч), что позволяет использовать ее в качестве живого корма для пресноводных аквариумных рыб.

Яйца прогидротированы (оводнены), и эмбрионы развиваются лишь тогда, когда соленость опускается ниже 85‰. При более высокой солености яйца не могут проклюнуться, поскольку они не гидратируются. Для выклева науплиусов, роста, формирования молоди и существования самок наиболее благоприятна соленость 30–80‰. Откладка диапаузирующих яиц происходит более интенсивно при солености воды более 90‰.

Удивительная жизнестойкость артемии проявляется и в отношении к температурному режиму водоемов, где она обитает. В течение года температура воды там колеблется в пределах от -20 до $+30^{\circ}\text{C}$, а в отдельных районах этот диапазон еще шире. В то же время артемия – летняя теплолюбивая форма: оптимальная температура для активной фазы ее жизни составляет $25-28^{\circ}\text{C}$, но она может существовать и при $35-37^{\circ}\text{C}$. При понижении температуры ее жизненные процессы замедляются, и при температуре менее 5°C она, как правило, погибает, хотя известны случаи, когда вмерзшие в лед рачки после оттаивания оживали. Дегидротированные яйца сохраняют выживаемость даже при таких температурах, которых нет в естественных условиях: до -200°C и $+130^{\circ}\text{C}$.

Артемия очень лабильна в отношении содержания растворенного кислорода в среде. Нижней летальной кислородной границей для них является $0,17$ мг/л. Молодь артемий также переносит существенное понижение содержания кислорода. Оптимальное содержание кислорода для артемии на этих этапах составляет $6-8$ мг/л. В период формирования зародыша требуется повышенное содержание кислорода на окисление запасных питательных веществ, используемых эмбрионом, и дыхание ($10-12$ мг/л).

Пороговая концентрация кислорода для взрослой формы очень низкая – $0,5$ мг/л, а для науплиев и того меньше – $0,3$ мг/л. Рачок живет до двух часов даже в анаэробной (бескислородной) среде.

Отношение к свету у только что выклюнувшихся науплиусов и у рачков на более поздних стадиях различно. Науплиусы проявляют способность к положительному фототаксису. Это связано с тем, что в освещенной зоне, в поверхностных слоях воды, они находят лучшие условия питания и большее количество кислорода. Взрослые рачки положительно реагируют на свет при понижении содержания кислорода в воде.

В естественных местах обитания артемии рН воды бывает как нейтральным, так и щелочным. Яйца при инкубировании выдерживают значительные колебания рН, но эффективность выклева значительно увеличивается, если рН находится в диапазоне $8-9$.

Биотехника массового получения науплиусов

Биотехника массового получения науплиусов артемии салина включает следующие основные этапы: заготовку и очистку яиц; хранение; активацию; инкубацию яиц. Они тесно связаны между собой и представляют единый процесс.

Заготовка и очистка яиц. Сбор артемии начинается с момента массового появления диапаузирующих яиц. Вылов яиц из воды можно начинать со второй половины лета, все осенние и зимние месяцы и ранней весной до прогревания воды до 10–14°C и выклева первых науплиусов. Наилучшее время для сбора яиц артемии – осень.

Сбор яиц артемии на берегу не представляет большой сложности. Наиболее чистые яйца из свежих выбросов и из толщи воды, где количество хороших составляет 80–95 % от общей массы. Свежие выбросы следует искать на пологих подветренных берегах, особенно много яиц скапливается в естественных ловушках (косы, небольшие заливы и бухточки). Выбросы имеют вид полосы, идущей параллельно береговой линии. Свежие выбросы имеют желтовато-розовую окраску, старые – серую или коричневую.

Свежие яйца из выбросов на берегу осторожно собирают лопатой или совочком, не захватывая грунт.

Запасы яиц артемии сильно варьируют на отдельных водоемах или на одном водоеме в разные годы. Рационально, изымая яйца из водоема, оставлять определенную часть для естественного воспроизводства. Неоправданно интенсивная заготовка яиц привела к подрыву запасов артемии в уникальном водоеме – Большом Соленом Озере (штат Юта, США), являющимся основным поставщиком яиц артемии на мировом рынке.

При производственном получении науплиусов для кормления личинок рыб важное значение имеет процент выклева.

Яйца, собранные летом или осенью, дают без специальной обработки 3–5 % выклева, несмотря на высокое содержание в них живых эмбрионов.

Прежде чем приступить к заготовке яиц следует определить степень их доброкачественности, так как даже при осмотре под лупой мертвые яйца и нераскrojившаяся скорлупа схожи с доброкачественными.

Существует несколько способов определения качества сбора:

1. Яйца раздавливают между двумя предметными стеклами и рассматривают в лупу 10–15-кратного увеличения. Наличие жирных пятен свидетельствует, что яйца живые (нельзя путать с пятнами, оставшимися при раздавливании скорлупы яиц, заполненной через трещину вязким светлым илом).

2. Часть яиц опускают в прозрачный сосуд (пробирку или стакан) с пресной водой. Скорлупа всплывает наверх, а доброкачественные яйца опускаются на дно (иногда заполненная илом скорлупа также опускается на дно).

3. Небольшое количество яиц зажимают между подушечками двух пальцев, затем делают несколько перетирающих движений и яйца рассматривают непосредственно на пальце через лупу 10–15-кратного увеличения. Если материал скатывается в веретенца или рассыпается на чешуйки, он недоброкачественный, если остался в виде отдельных яиц – доброкачественный.

Очистку проводят несколькими способами. Механический с помощью сит, но это не обеспечивает удаление всех нежелательных примесей (остаются идентичные по размеру яйцам примеси).

После механической очистки применяют очистку по удельному весу. В пресной воде пустые скорлупки всплывают наверх, а яйца и частицы песка оседают на дно (в течение часа происходит набухание яиц и их осадка на дно). В соленой воде живые яйца всплывают в верхний слой воды, а песок оседает на дно.

Хранение большого количества покоящихся яиц целесообразно проводить в сухом виде. Влажность высушенных яиц не должна превышать 2–5 %. Высушенные яйца хранят в темном прохладном сухом помещении в водо- и воздухонепроницаемой упаковке. Такие яйца могут храниться месяцами. При хранении их на открытом воздухе они гидратируются, вследствие чего может произойти разрыв оболочек. Для длительного хранения в тепле они должны быть упакованы в бескислородных условиях. Это обычно делается под вакуумом в жестяных банках. Такие яйца могут храниться годами. Гидротированные яйца могут храниться при температуре от -18°C до $+4^{\circ}\text{C}$ в темном месте.

Активация яиц артемии салина – основной момент биотехники массового получения науплиусов. Активирующее действие на яйца оказывает свет и химические реагенты: сода, бура, органические растворители – ацетон, бутанол, этиловый эфир. При обработке бурой выклев колеблется от 9 до 43 %, ацетоном – до 15 %, содой – до 13 %.

Низкий процент выклева науплиусов имеют яйца артемии, собранные в осенний период, в то время как у яиц, собранных весной, наблюдается высокий выклев. Значит в природных условиях активация яиц происходит в осенне-зимний период. Поэтому в основе одного из способов активации яиц лежит имитация природных условий. Замораживание в морозильнике (при температуре от -18°C до -25°C) дегидратированных в насыщенном рассоле NaCl чистых яиц через месяц повышает выклев на 8–30 %, через 4 месяца – на 43–50 %, через 6 месяцев – на 70 %. Активация холодом сухих яиц (влажность менее 10 %) не происходит.

В последние годы для активации яиц используют перекись водорода. Это связано с тем, что при развитии яиц от гастролы до науплиусов проходят активные окислительно-восстановительные процессы и эмбрион нуждается в большом количестве кислорода, и возникает необходимость использования его в виде перекиси водорода. Существует несколько способов обработки яиц перекисью:

- выдерживание яиц в течение 15–30 минут в 3%-ном растворе перекиси водорода с последующей промывкой;
- непосредственно внесение в инкубационную среду 1–3 мг/л 3%-ной перекиси водорода.

Инкубация яиц. Обычно яйца артемии инкубируют в 3–5%-ном растворе NaCl или Na_2SO_4 .

Для приготовления инкубационной среды используют поваренную нейодированную соль или природную морскую воду. Желательно добавлять 2 г технически чистого NaHCO_3 на 1 литр среды. Сода используется для уве-

личения буферной способности среды при инкубации яиц при высоких плотностях и для гарантии, что уровень рН не опустится ниже 8,0.

Для инкубации яиц необходимо высокое содержание кислорода в воде, которое обеспечивается непрерывной продувкой солевого раствора с содержащимися в нем яйцами, воздухом или кислородом. Плотность загрузки инкубационных устройств должна быть в пределах 4–8 г сухих яиц на 1 л инкубационной среды.

Оптимальные условия инкубации:

- температура должна быть в пределах 25–30°C;
- постоянная освещенность 1000–2000 люкс;
- соленость 30–35‰;
- кислород 2–4 мг/л;
- рН 8–9;
- сильная аэрация.

Оборудование для инкубации яиц *Artemia salina*

Для инкубации яиц артемии салина предложены различные способы и устройства. Главная трудность заключается в разработке приспособлений для отделения науплиусов от пустой скорлупы и невылупившихся яиц.

Инкубацию яиц желательнее проводить в прозрачных конусовидных аппаратах, аэрируемых снизу.

Наиболее пригодны для массового инкубирования аппараты, в которых процесс инкубации и отделение выклюнувшихся науплиусов от скорлупы и яиц происходит в одной и той же емкости.

В качестве примера можно привести инкубатор Хаслина, в котором отделение науплиусов от скорлупы и яиц происходит по разности удельных весов в одном и том же сосуде. Более легкая скорлупа всплывает на поверхность, непроклюнувшиеся яйца опускаются в нижние слои, а науплиусы плавают в толще воды в средней части инкубатора.

Инкубатор состоит из сосуда, имеющего форму перевернутого конуса. В нижнюю часть сосуда через горловину входит воздухопровод, заканчивающийся диффузором, наружный конец воздухопровода соединен с компрессором. Инкубационный сосуд в рабочем положении устанавливается на стойке и закрывается крышкой с отверстиями для выхода воздуха. Перед началом инкубации яиц сосуд заливают солевым раствором, близким по составу к морской воде.

После включения компрессора воздух по воздухопроводу попадает в диффузор и переходит в воду в виде мелких пузырьков, которые помимо аэрации поддерживают яйца во взвешенном состоянии и не позволяют им опускаться на дно сосуда. После 48 ч инкубации и выключения компрессора скорлупа яиц всплывает на поверхность, непроклюнувшиеся яйца оседают на дно между диффузором и стенками сосуда. Выклюнувшиеся науплиусы находятся в толще воды.

При массовой инкубации яиц артемии салина целесообразно использовать стеклянные сосуды типа аппаратов Вейса емкостью 6–8 и 40 л. В аппа-

рат Вейса заливают 3–5%-ный раствор сульфата или хлорида натрия, вносят яйца и включают аэрацию.

Аэрация идет с помощью компрессора, воздуховода и диффузора. Воздуховод с диффузором вводится в сосуд сверху, причем диффузор опускается в нижние слои раствора соли. Яйца сначала всплывают на поверхность, а затем по мере набухания опускаются в толщу воды и там постоянно перемешиваются с помощью барботажа воды сжатым воздухом. После окончания инкубации и выклева науплиусов (48 ч) диффузор извлекают из сосуда, а его содержимое сливают через сачок из мельничного газа № 60 и переносят в такой же аппарат с пресной водой, где происходит разделение науплиусов и яиц.

Средний суточный съем науплиусов составляет 9–10 г/л. В пересчете на общепринятую единицу продуктивности культуры живых кормов это составит 9–10 кг/м³ в сутки.

При хорошем качестве яиц суточный съем достигает 25 г/л, а отношение массы яиц к массе науплиусов равно 1:2.

Успех инкубации зависит от комплекса методических приемов, составляющих единую биотехнику массового получения науплиусов этого рачка для кормления личинок рыб на ранних стадиях развития. Эффективность использования этого живого корма зависит от правильного сбора, очистки, хранения и активации яиц и на последнем этапе – от конструктивных особенностей инкубационных аппаратов и технологии инкубации.

Декапсуляция яиц

Декапсуляция, т. е. снятие наружных оболочек, является путем повышения эффективности использования яиц. Оболочка покоящегося яйца артемии состоит из трех хорошо различимых слоев: двух слоев хитиноподобного хориона и внутренней эмбриональной кутикулы. Наружный (кортикальный) слой хориона толщиной около 1 мкм состоит из плотного вещества, неразрушаемого трипсином. Альвеолярный слой хориона довольно толстый (6–7 мкм), внутри него находятся соединенные друг с другом полости. Этот слой скорлупы играет существенную роль при гидратации и дегидратации яиц, принимая в полости или отдавая из них значительное количество воды.

Хорион, непереваримый для большинства рыб и беспозвоночных, легко растворяется в растворах гипохлорита, в результате чего эмбрион остается в тонкой и мягкой эмбриональной кутикуле, которая легко переваривается в организме животных. Функция кутикулы состоит в защите появляющегося науплия от повреждений о края скорлупы при выклеве.

Декапсуляция яиц представляет собой экзотермическую реакцию между ионами гипохлорита и веществами хориона яиц, которые под действием этих ионов окисляются.

Преимущества декапсуляции

Применение метода декапсуляции яиц артемии дает следующие преимущества:

- прежде всего упрощается техника инкубации яиц, так как не требуются сепараторы для отделения науплиев от оболочек, которые растворяются при

обработке. При этом уменьшаются потери яиц, сокращаются затраты ручного труда;

- полное отделение науплиусов от пустых оболочек не всегда выполнимо. Скорлупа и яйца, выклева из которых не происходит, при попадании в выростные емкости с личинками рыб заглатываются ими, но не перевариваются и иногда вызывают полную блокаду кишечника и гибель потребителей;

- освобожденные от хориона эмбрионы являются практически стерильными, так как в процессе обработки погибают находящиеся на оболочках бактерии, споры грибов и водорослей;

- науплии, полученные из декапсулированных яиц имеют несколько большую массу и более высокое содержание энергии, так как последняя не была потрачена на разрыв хориона при выклеве;

- повышается эффективность и синхронность выклева науплиусов;

- упрощается кормление личинок рыб высушенными декапсулированными яйцами, что позволяет автоматизировать процесс кормления.

Таким образом, полученные после декапсулирования эмбрионы можно использовать следующим образом. Во-первых, они могут быть инкубированы, и науплии будут использованы традиционным путем. Во-вторых, некоторыми видами рыб и беспозвоночных они могут употребляться непосредственно, без доинкубации. В-третьих, могут быть законсервированы в насыщенном солевом растворе и храниться в нем без снижения процента выклева в течение нескольких месяцев, а по мере надобности их можно инкубировать или использовать в корм в таком виде. В насыщенном солевом растворе происходит дегидратация (обезвоживание) эмбрионов, и метаболические процессы приостанавливаются. Для продолжения развития эмбриона его надо обводнить – поместить в воду соленостью ниже 85 ‰ (обычно 5–30 ‰).

Методы консервации артемии

Наиболее экономичным является использование свежевыклюнувшихся науплиусов, а это значит, что инкубацию нужно проводить ежедневно. Значительное облегчение в работах на аквахозяйствах приносит хранение свежевыклюнувшихся науплиев в холодильнике (0–4°C) в аэрируемых емкостях при плотности посадки до 15 тыс. экз. на 1 л в течение 1–2 сут. После этой операции почти у всех рас выживаемость науплиев остается выше 90 % (даже через сутки после перенесения науплиев из холодильника в культуральный танк при температуре 25°C), содержание энергии и сухая масса науплиев уменьшаются незначительно (не больше чем на 7–8 %).

Живые корма можно сохранять замораживанием и сушкой. Живые кормовые организмы собирают, очищают, сортируют и с целью обезвоживания распределяют на поверхности гипсовой плиты (либо на фильтровальной бумаге, цементной плите, холсте и т.д.), время обезвоживания не более 10–15 мин. Затем обезвоженных личинок собирают, взвешивают и распределяют на поддоне для дальнейшего замораживания. Толщина слоя при этом равна 6,3–12,7 мм (средняя и наиболее оптимальная толщина – 9,5 мм). Личинок подвергают резкому охлаждению при температуре – 60°C со временем выдержи-

вания 10–15 мин. Затем температуру уже замороженных личинок повышают до -35 – 40°C и сразу же переносят в сушильную камеру, давление в которой падает до 0,02 мм рт. ст., т. е. ниже давления насыщенных паров льда при температуре от -40 до -50°C . В процессе сублимационной сушки (6–7 ч) необходимо обеспечить подвод тепла во избежание дальнейшего понижения температуры. После обработки содержание влаги составляет менее 3 % и они приобретают белую окраску. Продукт, изготовленный предлагаемым способом, сухой, неклеякий, белый (в виде кубика с внешним белым слоем и буровато-красным внутри). При намачивании он поглощает воду и восстанавливает свой первоначальный вид.

Тема: МЕТОДЫ КОНТРОЛЯ ЗА ПОДВИЖНОСТЬЮ ЭМБРИОНОВ, ЛИЧИНОК И ВЗРОСЛЫХ РЫБ В НЕЙРОБИОЛОГИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЯХ. МЕТОДЫ РАБОТЫ НА ПРОГРАММНОМ КОМПЛЕКСЕ NOLDUS

1. Контроль подвижности эмбрионов и личинок в нейробиологических исследованиях.

В ходе исследований осуществляется ежедневная замена инкубационной среды со свежей порцией токсиканта, а также учет летальных, сублетальных и тератогенных эффектов, с последующим расчетом LD_{50} , процедуры Каплан-Мейера, различных индексов морфологических аномалий. Через 24, 30 и 120 часов после оплодотворения эмбрионы проходят нейробиологическое тестирование в тесте спонтанного сворачивания хвоста (spontaneous tail coiling, STC); в тесте фотомоторного ответа (photomotor response, PMR) и в тесте локомоторного ответа (locomotor response, LMR), соответственно.

При STC-тесте, 96-луночный планшет с эмбрионами помещают на платформу с инфракрасной подсветкой и затем накрывают затемненным боксом, поддерживая температуру ($28,0^{\circ}\text{C}$). Видео активности эмбрионов записывают в течение 1 минуты в темноте, после 5 минут адаптации. Для записи активности эмбрионов используют камеру Basler, оснащенную инфракрасным фильтром. После последнего измерения 96-луночный планшет с эмбрионами помещают в термостат для дальнейшей инкубации.

Методика PMR-теста в основном схожа с методикой STC-теста, за исключением наличия светового воздействия в следующем режиме: 20 сек темноты; 1 сек яркого верхнего света; 19 сек темноты; 1 сек яркого верхнего света; 19 сек темноты.

Для проведения LMR-теста, 96-луночный планшет со свободными эмбрионами, также помещают на платформу с инфракрасной подсветкой и затем накрывают затемненным боксом, поддерживая температуру ($28,0^{\circ}\text{C}$). Видеозаписи подвижности личинок записывают с использованием следующих настроек освещения при температуре 28°C после 5 мин темновой адаптации: 5 мин (свет) – 5 мин (темнота) – 5 мин (свет) – 10 мин (свет) – 20 мин

(темнота) – 10 мин (свет) и анализируют с помощью программного обеспечения EthoVision XT (Noldus, Нидерланды) в режиме DanioVision с использованием камеры микроскопа Basler, оснащенной инфракрасным фильтром. Интервал записи составляет 15 секунд.

Потенциал выявления взаимодействия химических веществ с нервной системой с помощью поведенческих тестов на данио рерио был признан мировым сообществом. При этом наиболее часто используемые поведенческие тесты это – STC, PMR и LMR. В специализированной лаборатории «Физиология рыб» были успешно апробированы все три указанных поведенческих теста.

Тест STC – это оценка первой двигательной активности, генерируемой развивающейся нейронной сетью, которая возникает в результате иннервации мышцы. Предполагается, что это событие важно для вылупления эмбриона из хориона. Частотные изменения STC используются в качестве инструмента для обнаружения воздействия нейроактивных химических веществ на развивающийся эмбрион.

Тест PMR – это оценка эмбрионального движения, вызываемое световым стимулом высокой интенсивности (длина волны от 300 до 700 нм). Этот ответ не зависит от восприятия света глазами и опосредуется через фоторецепторы в развивающемся заднем мозге. PMR можно разделить на четыре большие фазы: предстимульная фоновая фаза, латентная фаза, фаза возбуждения и рефрактерная фаза. Визуализация этих фаз PMR используется для химической классификации и скрининга лекарств. Как STC, так и PMR представляют собой конечные точки, измеряемые на стадии до вылупления эмбриона данио рерио.

Тест LMR – это оценка как спонтанного, так и индуцированного чередование света, локомоторного ответа свободных эмбрионов (личинок). При LMR-тесте эмбрионы слабо двигаются при освещении светом, но демонстрируют увеличение активности при переключении со света на темноту. Поэтому для мониторинга такого поведения применяют циклы свет–темнота. LMR оценивается путем регистрации различных конечных точек плавательной активности, таких как время плавания, расстояние плавания, скорость плавания (рассчитанная из расстояния и времени) и угол плавания.

Основной целью вышеперечисленных тестов является выявление гипо- и/или гиперактивности эмбрионов под влиянием различных химических веществ.

В некоторых исследованиях дифференциация между гипо- и гиперактивностью была предложена в качестве потенциального показателя нейроактивности химических веществ. Предполагается, что нейроактивные вещества способны модулировать нервные рецепторы, что приводит к гипо- или гиперактивному поведению. Например, Vliet и др. использовали реакцию STC в качестве метрики для скрининга библиотеки из 1280 фармакологически активных соединений на нейроактивность. Рейф и др. использовали гипо- или гиперактивность, наблюдаемую в различных фа-

зах PMR, для характеристики набора из 1060 химических веществ.

Обоснование вышеупомянутых скрининговых исследований заключалось в том, что вещества с одинаковым или сходным способом действия будут вызывать только гипо- или гиперактивность. Однако возможно, что одно и то же вещество может вызывать как гипо-, так и гиперактивность (двухфазная активность) в зависимости от уровня концентрации или продолжительности воздействия.

Эмбрионы рыб являются удобной моделью для оценки нейротоксичности химических веществ. Благодаря простоте содержания и быстрому половому созреванию — данио рерио получили широкое распространение в качестве модельного объекта в различных медико-биологических направлениях.

Потенциал выявления взаимодействия химических веществ с нервной системой с помощью поведенческих тестов на данио рерио был признан мировым сообществом, при этом тесты STC, PMR и LMR претендуют стать наиболее популярными стандартизированными методами при оценке нейротоксичности химических веществ. В ходе исследований, были апробированы методы оценки потенциальных нейротоксических веществ с помощью STC, PMR и LMR тестов, а также сформированы рекомендации к техническим и методическим параметрам, направленные на совершенствование и унификацию использования указанных методик и тестов.

2. Методы работы на программном комплексе Noldus

Программный комплекс Noldus включает в себя различные системы. Основной из которых, для нейробиологических исследований, является система **EthoVision XT**.

Система для взрослых рыб использует видео-слежение. Она может отслеживать одну или несколько рыб в аквариуме. Программное обеспечение EthoVision XT является отраслевым стандартом для научного отслеживания видео. Он работает на специально сконфигурированном и предварительно установленном компьютере.

Система EthoVision XT по проведению экспериментов по аквакультуре включает в себя программное обеспечение EthoVision XT, компьютер, лабораторную цветную камеру GigE. Система обеспечивает автоматическое отслеживание и анализирование поведения рыб всех возрастов (от личинок до половозрелых особей) при различных этологических тестах принятых в современной практике ихтиологии и аквакультуры (открытое поле, водные лабиринты Морриса и др.). Система динамична и при необходимости может использоваться для анализа поведения других лабораторных животных (например, лабораторных мышей).

База EthoVision® XT предоставляет все необходимое для отслеживания и анализа движения, активности и поведения 1 гидробионта в 1 арене. Неважно, какой тип рыбы вы изучаете, отслеживаете ли вы прямо в аквариуме, емкости, многокамерная установка или небольшой контейнер со стороны или

сверху, EthoVision XT будет надежно отслеживать и анализировать, как движутся Ваши гидробионты. Он также проведет вас через весь эксперимент, от создания проекта до сбора и анализа данных.

Отслеживание в воде и быстрые движения не представляет проблемы для EthoVision XT.

Углубленный анализ ваших данных.

EthoVision XT полезен не только для сбора данных! В настоящее время доступен самый развернутый и углубленный анализ. В дополнении к стандартным контролируемым параметрам, такие как скорость, расстояние и время, проведенное в определенной зоне, EthoVision XT предлагает углубленный анализ, например, времени проведенное неподвижное, низкая активность и ускорение (плавные всплески). Вы также можете создавать пользовательские параметры, определяя переменные нескольких условий.

Очень легко анализировать зонные переходы, например, в лабиринте Y или T, или новый резервуар.

Эффективные критерии выбора данных EthoVision XT позволяют анализировать любые зоны нахождения гидробионта. Вы можете вложить свои данные в зависимости от времени, зоны или поведенческого состояния. Результаты могут быть визуализированы на графике временного события вместе с данными дорожки и видеофайлом, чтобы обеспечить мгновенную обработку Ваших данных.

Ручная запись событий.

С помощью встроенного ручного регистратора событий вы можете аннотировать поведение во время прямого или автономного приема, в режиме реального времени или на более низкой скорости, а также уточнить или отредактировать полученные события после этого.

Функции:

- Обнаружение точки центра тела.
- «Обнаружение активности» (в дополнение к отслеживанию видео): определяет пиксельные изменения на арене для каждого кадра, идеально подходит для дискриминирующие всплески движения.
- Пакетный захват позволяет вам одновременно получать треки из многих видеороликов.
- Автоматический и пакетный анализ – одним нажатием кнопки анализируйте свои испытания на основе любого выбора данных и параметров.
- Встроенная визуализация и встроенная экранная запись позволяют создавать видеоклипы для презентаций.
- Все параметры (зависимые переменные) доступны для использования в пробном контроле.
- Настройте автоматическое начало или конец отслеживания, когда выполняются заранее заданные временные или пространственные условия.
- Приобрести серию испытаний с живой видеопотоки и установить условия начала и окончания и промежуточные периоды.
- Минимальное перемещение расстояния.
- Ручной регистратор событий.

- Одновременная запись в реальном времени и запись видеофайлов.
- Интегрированная визуализация полученных дорожек и сохраненного видеофайла.
- Встроенный анализ всех параметров; пробной и групповой статистики, представленной в таблицах и графиках.
- Выбор свободного интервала для определения вашего пользовательского анализа (например, время, которое потребовало 10 секунд совокупного интереса к одному из зон Т-лабиринта).
- Зоны на арену могут быть определены для измерения поведенческих параметров в отношении зон, представляющих интерес.
- Зоны можно переопределить после сбора и использовать для анализа данных.
- Экспорт графических изображений (тепловых карт и графиков) и таблиц как исходных и статистических данных для дальнейшего анализа.
- Экспорт данных необработанных дорожек.

DanioVision – это комплексная система, предназначенная для высокопроизводительного отслеживания личинок рыбок данио (*Danio rerio*) в многолучевых планшетах. Приведенный в действие EthoVision® XT, он позволяет с высокой точностью отслеживать до 96 личинок одновременно. DanioVision дает вам полный контроль над условиями эксперимента.

Он имеет следующие компоненты:

- Камера наблюдения DanioVision с цифровой камерой
- Блок контроля температуры
- Выстукивающее устройство (звуковой / вибрационный стимул)
- Программное обеспечение для отслеживания EthoVision XT
- Профессиональная рабочая станция со всем предустановленным программным обеспечением

Система наблюдения DanioVision с цифровой камерой

Тестирование высокой пропускной способности стало проще

DanioVision™ разработан как система «включай и работай»; Просто подключите питание, подключите камеру наблюдения к компьютеру с EthoVision XT, и вы готовы к работе! Вы можете использовать мастер в EthoVision XT, чтобы быстро настроить эксперимент с предустановленными шаблонами эксперимента или своими собственными предварительно определенными шаблонами. Отслеживание высокой пропускной способности еще никогда не было таким простым!

Смотровая камера DanioVision имеет компактный и удобный дизайн. Содержит:

- Емкость с инфракрасной (ИК) подсветкой, который подходит для любой стандартной многолучевой чашки, чашки Петри или другого небольшого контейнера.
- Подсветка белого света, управляемая системой слежения от 0 до 5000 люкс.

- Высококачественная чувствительная к инфракрасному излучению цифровая камера GigE (640 * 480 при 60 к / с / 800 * 600 при 30 к / с / 1280 * 960 при 15 к / с)

В целом, эта система предлагает идеальную контролируемую среду для отслеживания активности, движения и поведения личинок рыбок данио и других мелких организмов.

Легко использовать

Камера наблюдения предназначена для обеспечения как идеальной среды для отслеживания, так и удобной работы с системой. Просторная конструкция и большое отверстие обеспечивают легкий доступ к бассейну и оборудованию внутри. Существует достаточно места и соединений TLL, чтобы добавить дополнительное оборудование, такое как стимулирующие устройства. Бассейн позволяет размещать многолуночные планшеты, чашки Петри и другие контейнеры и имеет инновационный дизайн, который помещает контейнер в точное положение для отслеживания, так что вам не нужно настраивать определение арены (в EthoVision XT) между испытаниями. Система закрывается плавно, чтобы не беспокоить ваших животных.

Устойчивое изображение без искажений

Для обеспечения надежного изображения для отслеживания DanioVision™ оснащен антивибрационными ножками для поглощения ударов по изображению, которые могут возникнуть в лабораторных условиях. Высокоскоростная цифровая камера GigE и инновационный оптический дизайн камеры наблюдения обеспечивают идеальный обзор всей скважины. Держатель пластины с ИК-подсветкой обеспечивает равномерное ИК-освещение каждой лунки и предотвращает затенение. Комбинация ИК-подсветки и ИК-чувствительной камеры обеспечивает надежное слежение в темноте. Линза Френеля предотвращает искажение обзора краев скважинной плиты; для других областей тестирования вы можете перевернуть его обратно в вертикальное положение вне поля зрения камеры.

Обнаружение движения

Поскольку генетика или лечение могут привести к тому, что ваши животные будут двигаться очень быстро, ваша камера наблюдения DanioVision оснащена цифровой камерой GigE. Эта комбинация позволяет точно определять быстрые движения. EthoVision XT автоматически собирает и анализирует треки для вас, и он может записывать видео одновременно.

Контроль над светлыми и темными настройками

Вы можете контролировать внутренние условия белого света с EthoVision XT. Контроль условий освещения предлагает несколько преимуществ для вашего обучения. Вы можете использовать световой импульс, чтобы вызвать испуганный рефлекс, или вы можете постепенно регулировать белый свет (от затемненного до яркого и наоборот), чтобы имитировать цикл день/ночь. Конечно, оба действия могут быть запрограммированы на автоматическое выполнение в зависимости от условий пользователя (в программном обеспечении EthoVision XT). Интенсивность белого света регулируется от полной темноты до 5000 люкс.

Контроль температуры

Блок контроля температуры позволяет контролировать и контролировать температуру воды в бассейне. Это устраняет необходимость работать в полностью климатизированных помещениях и имеет важное значение для предотвращения необъективных результатов, поскольку активность личинок рыбок данио и других мелких организмов может сильно зависеть от температуры.

Звуковой/вибрационный стимул

Устройство для постукивания является дополнительным устройством, которое может быть встроено в Наблюдательную камеру и обеспечивает звуковой / вибрационный стимул, который может быть настроен на различные силы и управляться с помощью программного обеспечения для отслеживания. Он может быть использован, чтобы вызвать реакцию испуга, похожую на импульс белого света.

Блок контроля температуры DanioVision

Блок контроля температуры, подключенный к наблюдательной камере DanioVision, удерживает воду под пластиной скважины при определенной пользователем температуре. Это предотвращает изменения температуры, которые могут сделать ваши данные недействительными.

Компактный и готов к использованию. Подключить и использовать прибор очень просто: подключите две водяные трубки и два кабеля, залейте водяной резервуар в наблюдательную камеру и установите температуру. В течение нескольких минут желаемая температура достигается и остается постоянной в течение всего эксперимента, обеспечивая высокое качество данных.

Функции:

- Точное поддержание температуры воды на протяжении всего вашего проекта
 - Идеальная совместимость с DanioVision
 - Обогрев и охлаждение одним блоком
 - Простота в эксплуатации – готов к использованию всего за несколько минут

Система DanioVision работает на EthoVision XT; известное программное обеспечение для отслеживания видео, которое доказало свою научную ценность на протяжении более 15 лет и используется более чем 2100 различными исследовательскими группами по всему миру. Количество научных публикаций, написанных по исследованию рыбок данио с помощью EthoVision XT, в настоящее время превышает 300. Общее количество научных публикаций с EthoVision XT превышает 3500.

EthoVision XT – это проверенная и простая в использовании программа, которая позволяет полностью и автоматически контролировать условия эксперимента в системе DanioVision. Вы можете отслеживать и записывать видео одновременно, вы можете воспроизводить и повторно использовать ваши данные. Бесплатные лицензии на анализ: расширенный анализ данных ваших треков можно выполнить на любом другом компьютере, на котором

установлена EthoVision XT, бесплатно. Вам не нужно приобретать дополнительные лицензии для этого.

Программное обеспечение не ограничено для использования с Наблюдательной камерой DanioVision, вы можете использовать его для других целей, таких как отслеживание взрослых данио в Т-лабиринте для изучения обучения и памяти или нескольких аквариумов. Расширьте свои исследования, используя то же самое надежное программное обеспечение.

Лучшее программное обеспечение для отслеживания

EthoVision XT обеспечивает все необходимое для отслеживания и анализа движения, активности и поведения ваших животных в 96/48/24/12/6 лунках (круглых или квадратных). Мастер проведет вас через все этапы вашего эксперимента, от настройки вашего проекта до детального анализа полученных данных. Шаблоны для стандартных тестов уже включены в программное обеспечение, что позволяет быстро и легко начать эксперименты. Вы также можете определить свои собственные шаблоны для непрерывного использования и эффективности, гарантируя, что каждый исследователь в вашей лаборатории работает с одинаковыми настройками, обеспечивая качество наших данных.

Бесплатные лицензии на анализ

Еще одно большое преимущество EthoVision XT заключается в том, что вам нужен только лицензионный ключ для записи и отслеживания. Это означает, что вы можете установить программное обеспечение EthoVision XT на нескольких компьютерах и анализировать свои данные, когда и где это наиболее удобно для вас. Вы не привязаны к настройке отслеживания для вашего анализа.

Глубокий анализ

EthoVision XT предлагает самый мощный и углубленный анализ ваших данных треков, доступных в настоящее время на рынке. Измеряемые параметры включают в себя: скорость, пройденное расстояние, время, проведенное в зоне (внутренняя/внешняя), время, проведенное в неактивном или высокоактивном состоянии (например, для поведения испуга), вращения, конвульсии, средняя скорость и активность. Вы можете выбирать дорожки или части дорожек с помощью мощных критериев выбора данных, которые предлагает EthoVision XT. Выбор данных, при которых животные получают определенную обработку, позволяет анализировать только соответствующие данные. Вы можете вложить свои данные на основе времени, зоны или поведенческого состояния. Результаты можно визуализировать в виде графика времени-события вместе с данными дорожки и видеофайлом, чтобы обеспечить мгновенное неформальное ощущение ваших данных. Если вам нужно больше статистических данных, то доступен легкий экспорт в Excel и SPSS.

Полный контроль над вашим экспериментом.

Расширенный контроль пробной и аппаратной части позволяет вам определять свой конкретный протокол исследования и управлять внешним оборудованием из EthoVision XT. Система может автоматически запускать и останавливать сбор данных, а также управлять белыми огнями, имитируя днев-

ной / ночной ритм или создавая внезапный легкий «шок», приводящий в замешательство. Другим примером является то, что система позволяет вам контролировать и запускать программы программного обеспечения, а также лазер в настройке оптогенетики. Конечно, вы можете использовать «время» в качестве триггера, но вы также можете использовать «поведение» животного в качестве триггера.

Функции:

- Мастер, который проведет вас через настройку эксперимента, включая шаблоны проектов.
- Совместимость с различными пластинами (6, 12, 24, 48, 96).
- Максимальная скорость онлайн-обработки: 60 изображений/сек. Скорость автономной обработки не ограничена.
- Проверенные методы обнаружения объектов обеспечивают надежное отслеживание местоположения и/или активности.
- Обнаружение активности обнаруживает изменения на арене для каждого кадра, идеально подходит для обнаружения неактивного или высокоактивного поведения.
- Acquisition Пакетное приобретение; приобретайте треки из ваших видео в серии серий и экономьте драгоценное время.
- Tracking Одновременное отслеживание в реальном времени и видеозапись вашего эксперимента.
- Встроенный (пакетный) анализ всех важных параметров, например: скорость, пройденное расстояние, время, проведенное в зоне (внутренняя/внешняя), время, проведенное в неактивном или высокоактивном состоянии, вращения, конвульсии, средняя скорость и активность
- Бесплатные лицензии на анализ: анализируйте ваши данные вне настройки отслеживания.
- Определите свой конкретный протокол исследования и управляйте внешним оборудованием, таким как свет.
- Экспорт графических изображений и таблиц в виде необработанных и статистических данных (формат XLS) для дальнейшего анализа.
- Экспорт необработанных данных трека, например, в Microsoft Excel.

Преимущества:

- Система с высокой пропускной способностью.
- Аse простота использования; одна полная настройка.
- Проверенное решение с более чем 300 публикациями об исследованиях рыбок данио по всему миру.
- Экономьте время и уменьшайте человеческие ошибки, автоматизируя ваши эксперименты.
- Легко расширить свои исследования для взрослых рыбок данио.

Тема: АНАЛИЗ ЭМБРИОНАЛЬНОГО РАЗВИТИЯ ДАНИО РЕРИО. СТАДИИ ЭМБРИОНАЛЬНОГО РАЗВИТИЯ. АНОМАЛИИ В ЭМ- БРИОНАЛЬНОМ РАЗВИТИИ

В последние 40 лет в исследованиях эмбриологии позвоночных всё чаще предпочтение отдаётся изящной полосатой рыбке *Danio rerio* (отряд *Cypriniformes*, сем. *Cyprinidae*), известной под названием «рыба-зебра» (*zebrafish*). Благодаря легкости культивирования и получения массового материала, быстрой наступления репродуктивного периода (около трёх месяцев), высокой скорости эмбрионального развития и возможности получения гаплоидного потомства (что облегчает его генетический анализ), прозрачности зародыша (удобство для микроскопирования и киносъёмки), *zebrafish* сейчас является одним из наиболее популярных объектов биологии развития позвоночных животных. Для этого вида описано большое количество мутаций, часть которых прямо затрагивают ход эмбриогенеза, что позволяет использовать *Danio rerio* в качестве модельного объекта генетики развития. Более того, Данио является первым позвоночным, для которого был предпринят интенсивный мутагенез.

Путём обработки производителей мутагенами и селективного разведения потомства исследователи обнаружили тысячи мутаций генов, нормальное функционирование которых имеет критическое значение для развития Данио. Традиционный метод генетического скрининга (аналогичный широкомасштабному скринингу на *Drosophila*), позволяет выявлять дефекты развития на уровне отдельных групп клеток. Наконец, сходство программ развития у всех позвоночных определило важное место Данио в исследованиях генов, которые оперируют в эмбриогенезе человека. Известно, что зародыши Данио проницаемы для небольших молекул, вносимых в окружающую их водную среду. Это позволяет тестировать многие вещества, которые могут оказаться вредными для развития позвоночных животных и человека.

Учитывая все эти исключительные свойства Данио, многие специалисты биологии развития, полагают что, благодаря этой рыбке, можно получить детальную характеристику развития позвоночных.

Оплодотворение вызывает кортикальную реакцию, видимым проявлением которой является отставание от поверхности оолецмы яйца желточной оболочки и образование перивителлинового пространства, разделяющего наружную (хориальную, хорион) и внутреннюю (вителлиновую) мембраны. Последняя у *Danio rerio* представляет собой гомогенный гранулярный слой, покрывающий поверхность яйца. Она выполняет функцию избирательно проницаемой мембраны.

Для *Teleostei* характерен **меробластический тип развития**. Высокий уровень организации органов чувств, появление челюстей, резкое усиление двигательной активности и развитие хищничества – все это и многое другое создало у костистых рыб совершенно *новые возможности накопления энергии*, приведшие, в частности, к существенным видоизменениям оогенеза. Отмеченная уже у Круглоротых интенсификация вителлогенеза в полной мере проявилась у Костистых рыб, в ооцитах которых запасается исключительно

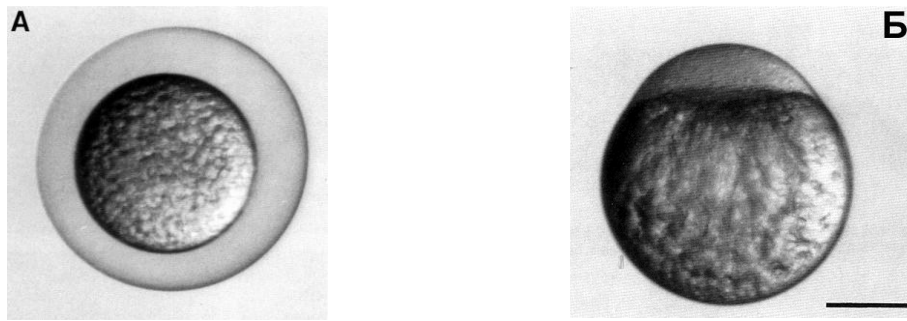
большое количество желтка. С этим связано появление целого ряда *особенностей эмбриогенеза* КР, которые отсутствовали у низших хордовых. В ходе эволюции рыб несколько раз независимым образом возникало *меробластическое дробление*. Большая часть Костистых рыб имеет *дискоидальный тип дробления*, при котором формирование зародыша происходит лишь в анимальном полушарии, тогда как в вегетативной области сосредоточен инертный желток.

Нельзя не заметить вместе с тем, что наблюдаемые у рыб интенсификация и изменение характера вителлогенеза, сделав шаг по пути автономизации эмбриогенеза и отдалив время перехода зародыша на активное питание, имели существенные филогенетические последствия, поскольку стали одной из важных предпосылок выхода позвоночных на сушу. Другим важным новшеством эмбриогенеза, сопряженным с дифференциацией яйцеклетки на две области, одна из которых предназначалась для сохранения энергетических запасов, было возникновение механизма ассимиляции этих запасов. В эмбриогенезе рыб появляются *внезародышевые структуры*, предназначенные для сохранения, переработки и транспортировки энергетических ресурсов. Появление таких структур и клеточного материала, непосредственно не участвующего в формировании тела зародыша, создало предпосылки для возникновения и эволюции разных форм живорождения, широко представленного в различных группах рыб и более высоко стоящих классах Позвоночных. Возникшие у рыб морфогенетические процессы и управляющие ими механизмы имели исключительное значение для эволюции всех позвоночных, включая высших Амниот.

Ранние процессы в зиготе Костистых рыб.

Параллельно с образованием перивителлинового пространства начинается процесс *биполярной дифференциации* (*разновидность ооплазматической сегрегации*) яйца, в ходе которого в результате направленных потоков цитоплазмы из желточной массы в направлении анимального полюса почти вся свободная от желтка цитоплазма сосредотачивается на вершине яйца в виде большей или меньшей припухлости (буторка). Так формируется *бластодиск*, в центральной части которого происходит *слияние пронуклеусов при оплодотворении*. Струйные движения цитоплазмы начинаются через 50 минут п/о и иссякают (у *D. rerio*) при 3-4 делении дробления. Предполагается, что эти потоки могут обеспечивать *перемещение гранул р-РНК* и гипотетических морфогенетических факторов, запускающих программу *дорсализации* в дробящемся бластодиске.

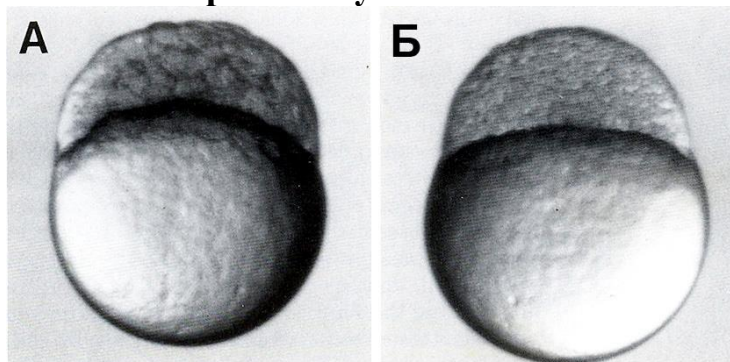
Анимально-вегетативная поляризация зиготы



Демерсальное яйцо *Danio rerio*. **А:** зигота в яйцевой оболочке через несколько минут после оплодотворения. **Б:** зигота без оболочки с анимальным полюсом наверху через 10 минут после оплодотворения. Здесь уже хорошо видно начало отмишивания свободной ооплазмы.

Дробление неполное (меробластическое или дискоидальное). Плоскости первых пяти делений дробления ориентированы перпендикулярно поверхности бластодиска, в последующем наблюдается чередование меридиональных и латитудинальных (широтных) борозд, возникающих синхронно с периодом 15 минут. До 16-клеточной стадии все бластомеры вместе с желточной сферой являются частями единой системы, и весь зародыш представляет собой синцитий (правильнее называть его симпластом) поскольку между желтком и цитоплазмой бластомеров отсутствует плазматическая мембрана и между отдельными бластомерами поддерживается высокая коммуникабельность. Её проявлением является синхронность клеточных делений, которая поддерживается у *Danio rerio* в течение 9 циклов, т.е. до стадии 512 клеток. В результате дробления бластодиск преобразуется в горку бластомеров, возвышающихся над поверхностью желточной сферы. В ходе дальнейшего дробления уменьшившиеся в размерах бластомеры все более тесно располагаются в этой горке, при этом группа ранее обособившихся бластомеров концентрируется ближе к поверхности, образуя сплошной поверхностный слой, в виде купола над желтком. Клетки, составляющие основную промежуточную массу, располагаются рыхло в жидкости, заполняющей пространство под куполом. С этого момента вся клеточная совокупность зародыша называется бластодермой. Такая многоклеточная бластодерма на стадии 128 клеток, получила название бластомерной бластулы (стереобластулы).

«Стереобластула» *Danio rerio*



Danio rerio. (А) Стадия 256 клеток. Перибласт ещё отсутствует, и нет бластоцеля. (Б) Т.н. «высокая бластула» или «бластомерная бластула» (по старой терминологии), симпласт перибласта содержит два ряда ядер

По мере увеличения числа клеток в зародыше происходит сегрегация трёх «клеточных линий». Раньше других обособляется слой поверхностных клеток кроющий слой. Клетки в этом слое уплощаются, а их деления совершаются только в плоскости слоя, так что, начиная со стадии 128 клеток, кроющий слой не поставляет клетки в подлежащие слои и никакого участия в формировании тела зародыша не принимает. Со временем клетки кроющего слоя дифференцируются в *перидерму*, покрывающую зародыш и желточную сферу. Кроющий слой и затем перидерма выполняет защитные функции, надёжно изолируя развивающийся зародыш вместе с его желточным мешком.

Второй специализированной областью оказывается желточный синцитиальный слой. Этот симпласт, лежащий под бластодермой, формируется у Данио, после 9-10 деления дробления в виде кольца по краю бластодермы в результате деления краевых клеток. Во время 10 деления цитоплазма одной из дочерних клеток вместе с ядром сливается с тонким цитоплазматическим слоем желточной сферы. Так возникает желточный синцитиальный слой или *перибласт* – особая провизорная многофункциональная структура развивающегося яйца костистых рыб. Ядра перибласта на стадии средней бластулы проходят три митотических деления, но митозы при этом не сопровождаются цитотомией. Затем деления в желточном синцитии прекращаются, а ядра начинают увеличиваться в размерах, возможно, в связи с полиплоидизацией. Перибласт – внезародышевая структура, которая с момента своего появления выполняет ряд важных морфогенетических функций:

1. Он выступает в качестве эквивалента «центра Ньюкупа» амфибий, влияющего на формирование «организатора» зародышевой оси в соответствующем участке зародышевого кольца.

2. Он играет роль индуктора или передатчика сигналов, индуцирующих транскрипцию ряда генов, ответственных за образование энтодермы и мезодермы из материала гипобласта.

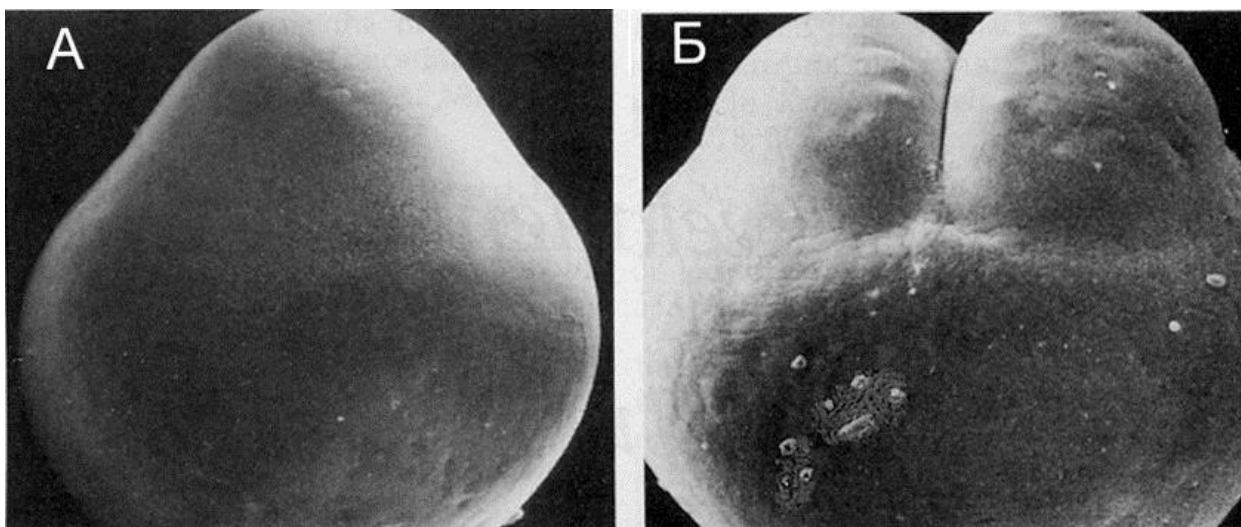
3. На более поздних стадиях развития перибласт (или вся желточная сфера) принимает активное участие в спецификации энтодермы (пищевод, желудок, кишечник, пищеварительные железы).

4. Играет роль «движителя» процесса обдукции (эпиболии).

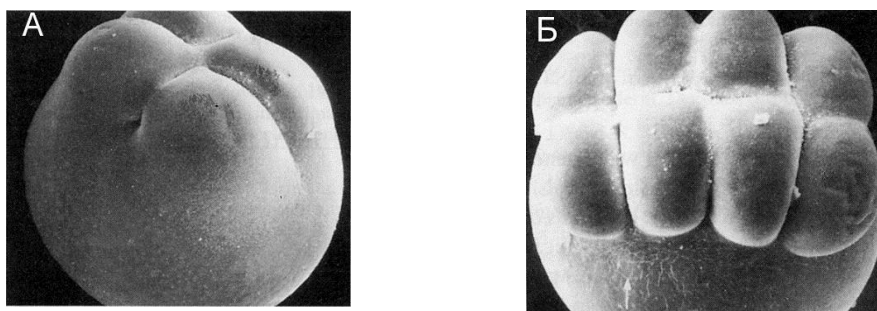
5. Принимает участие в ассимиляции белков желтка и поступлении их в клетки зародыша.

6. Ещё позднее он превращается в первичную выстилку желточного мешка рыб. Третья область бластодермы представлена т.н. «глубинными клетками», составляющими самую многочисленную популяцию, из которых возникает зародыш, собственно. Когда сформируется перибласт, зародыш костистых рыб претерпевает т.н. «*срдне-бластульный переход*» (midblastula transition), во время которого происходит удлинение митотического цикла, сопровождающееся утратой синхронности делений, активация транскрипции (начало морфогенетической функции ядер) и приобретение клетками подвижности. Полагают, что сигналом к началу событий этой трансформации служит стабилизация ядерно-цитоплазматического отношения в клетках зародыша.

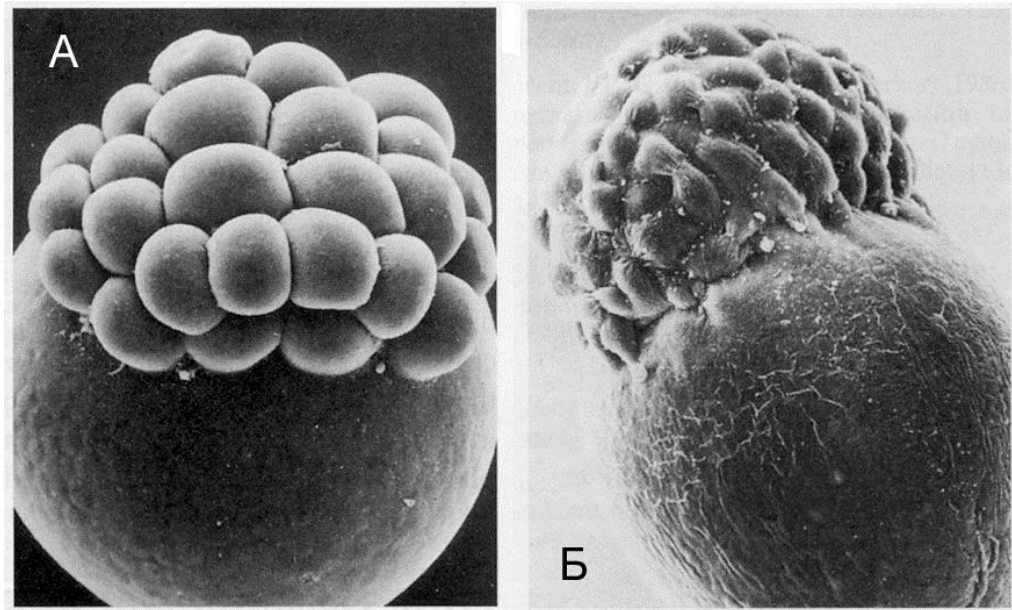
Дробление яйцеклетки Костистой рыбы



Табличное дробление яйцеклетки *Danio rerio*. А – зародыш на одноклеточной стадии, накопление свободной цитоплазмы на анимальном полюсе. Б – двухклеточный зародыш

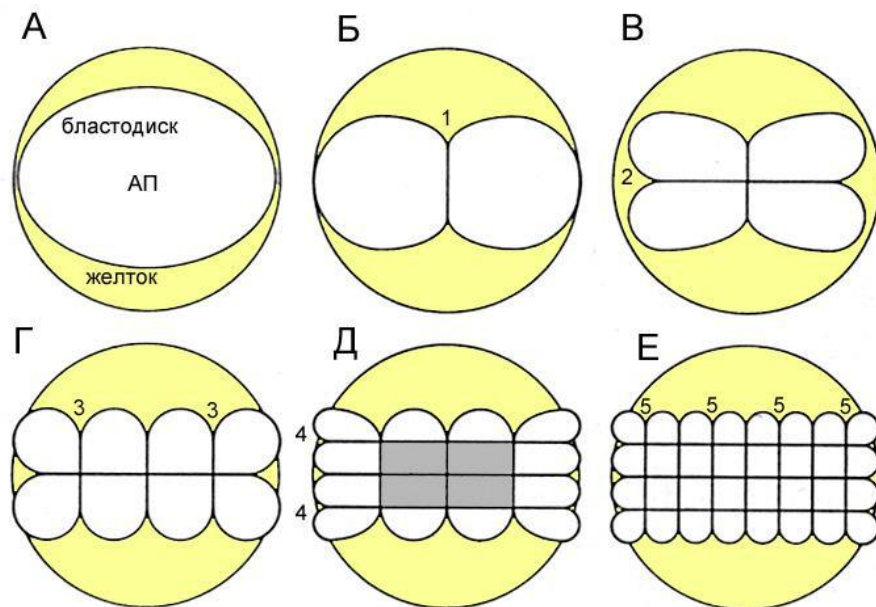


Danio rerio. **А** – четырёхклеточный зародыш, **Б** – восьмиклеточный зародыш, представленный двумя рядами из четырёх клеток, выступающих над объёмной желточной сферой (табличка бластомеров).

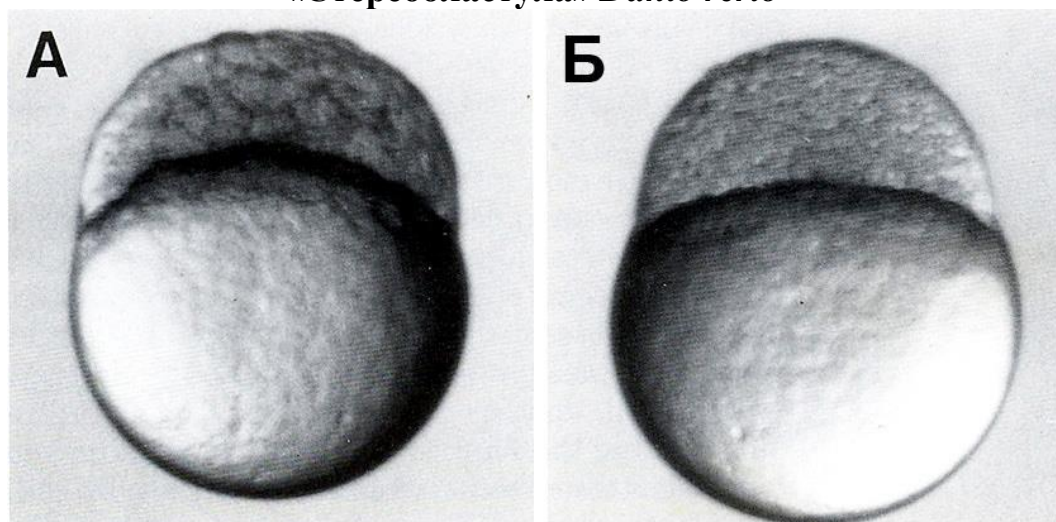


А – 32–клеточный зародыш *Danio rerio*. **Б** – 64–клеточный зародыш; бластодиск возвышается над желточной сферой

Схема табличного дробления у *Danio rerio*



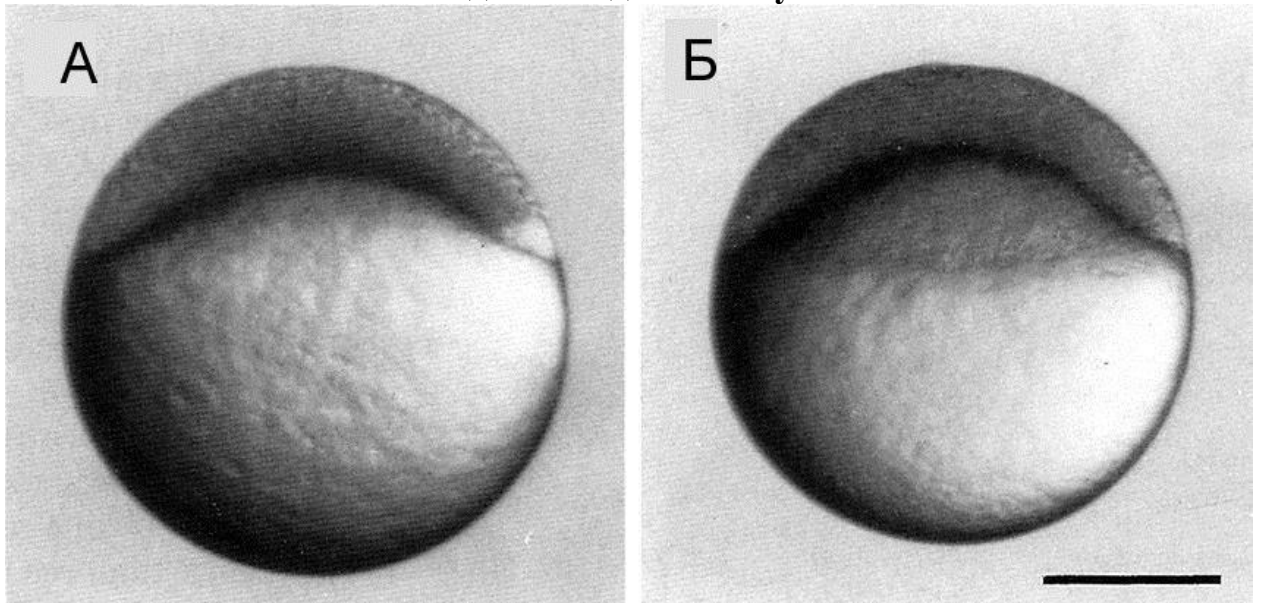
«Стереобластула» *Danio rerio*



Danio rerio. (А) Стадия 256 клеток. Перибласт ещё отсутствует, и нет бластоцеля. (Б) Т.н. «высокая бластула» или «бластомерная бластула» (по старой терминологии), симпласт перибласта содержит два ряда ядер

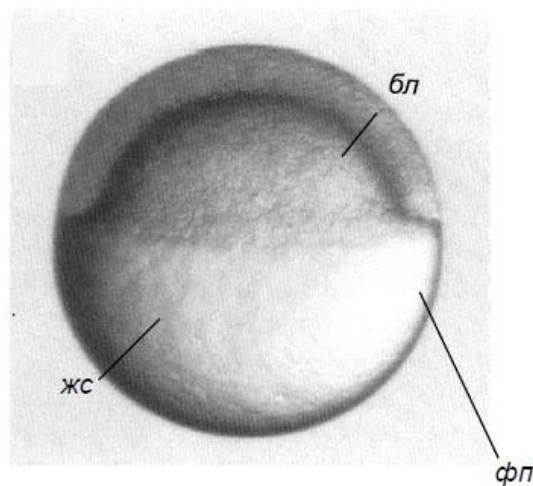
Вскоре после начала среднебластульного перехода рыхло расположенные бластомеры центральной группы постепенно смещаются к кроющему слою и вместе с ним образуют многослойную плотную стенку бластулы. Затем её наружная стенка принимает вид более ровной многослойной эпителиальной пластинки, и зародыш переходит на стадию эпителиальной бластулы. Одновременно с этими превращениями область желточной сферы под бластодермой начинает выпячиваться к анимальному полюсу, не оставляя свободного пространства между клетками и желтком. Вслед за формированием эпителиальной бластулы начинается процесс обрастания желточной сферы перибластом и сцепленной с ним в краевой зоне бластодермой. За этим процессом закрепилось не совсем корректное название эпиболии. В связи с этим А.К. Дондуа предложил называть это явление по аналогии с геологическим процессом обдукцией. Обдукция — надвигание океанической литосферы на континентальную кору. В результате формируется офиолитовый комплекс. Термин введен Р.Колманом в 1971 году. Обдукция в развитии костистых рыб первый морфогенетический процесс. Здесь обдукция – это обрастание бластодермой (потомки глубоких клеток вместе с кроющим слоем) желточной сферы (желточной клетки), в основе которого лежат три связанных и одновременно самостоятельных активности. Одной из них является распространение в направлении вегетативного полюса популяции ядер перибласта. В основе этого движения лежит сокращение микротрубочек особого аппарата (моторных молекул, Solnica-Krezel & Driver, 1994), связанного с ядрами синцития. Два типа организации микротрубочек в желточной клетке зародышей: а) в YSL сеть митотических и интерфазных микротрубочек; б) в YSL микротрубочки вытянуты вдоль анимально-вегетативной оси.

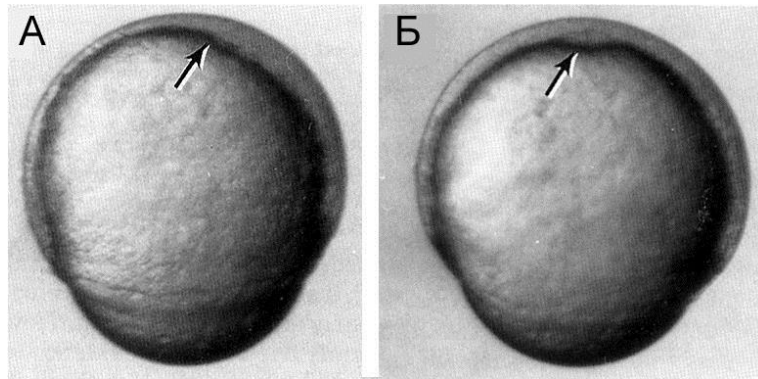
Поздние стадии бластулы



Danio rerio. А – «куполообразная» стадия (эпители-альная бластула);
Б – стадия 30% обрастания (поздняя бластула)

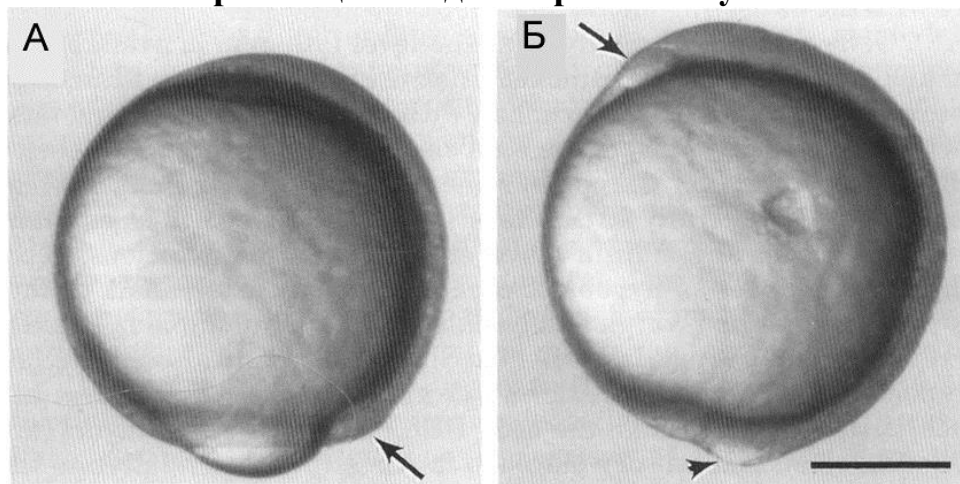
На фотографии показан зародыш *Danio rerio* на стадии 50% обрастания бластодермой (бл) желточной сферы (жс). Несколько ближе к вегетативному полюсу от границы бластодермы виден фронт обрастания перибластом (фп).





А – 70 % обрастания. Внешний вид зародыша *Danio rerio* сбоку; дорсальная сторона бластодермы (справа) толще вентральной стороны (слева); стрелка отмечает границу прехордальной пластики. **Б** – вид с вентральной стороны; видно центральное утолщение (прехордальная пластинка), показанное в центре бластодермы стрелкой

Завершающие стадии обрастания у *Danio*



А – стадия 90% обдукции («желточная пробка»); **Б** – обрастание завершилось, наконечник стрелки показывает хвостовой бугорок (хвостовую почку); стрелка отмечает зачаток железы вылупления

Механика процесса эпиболии (обдукции).

В основе обрастания бластодермой желточной сферы лежит сокращение внешнего желточного синцитиального слоя в результате активного эндоцитоза поверхности. В этом процессе играет активную роль поверхностный слой актиновых микрофиламентов. Вегетативно направленное движение фронта при перемещении желточной сферы в ходе обрастания связано с образованием и поддержанием особой зоны перибласта, с которой с определенного момента тесно спаяна краевая зона кроющего слоя бластодермы. Распространение этого слоя само по себе пассивно и обеспечивается силами натяжения, возникающими во фронтальной зоне перибласта в результате движения на поверхности последней волны складкообразования и интернализации свободной складчатой поверхности мембраны.

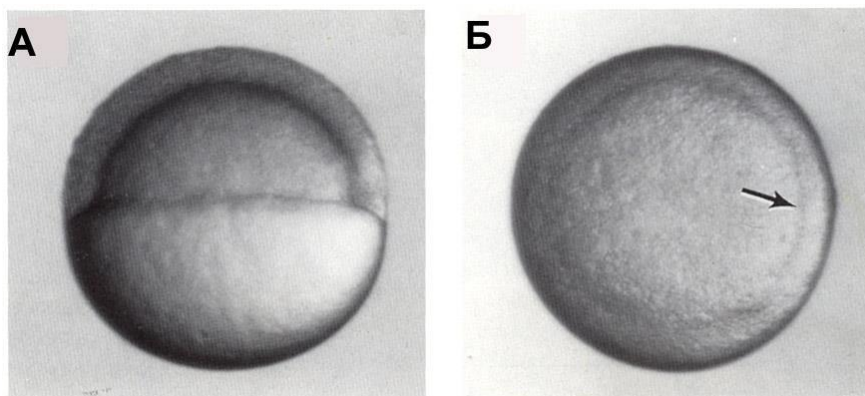
Значение разглаживания складчатой поверхности внутреннего YSL.

Эта область действует в уступающем режиме. С другой стороны, затаскивание кроющего слоя в направлении вегетативного полюса поддерживается уплощением составляющих его клеток. Глубинные клетки бластодермы также вовлекаются в движение эпиболии, но их распространение по поверхности перибласта обеспечивается с помощью реаранжировок клеток по типу радиальной интеркаляции.

На следующем этапе развития происходит формирование зародышевых листков – гастроляция. После того, как бластодерма покрывает 30% поверхности желтка, по периметру бластодермы на границе глубинных клеток образуется утолщение – зародышевое кольцо. По всей окружности клетки кольца под кроющим слоем образуют наружный пласт клеток – эпибласт и внутренний пласт – гипобласт (или мезэндодерму). Образование мезэндодермы происходит в результате инволюции слоя глубинных клеток и выселения отдельных клеток из его состава (ингрессии). На дорсальной стороне медиолатеральные интеркаляции клеток эпибласта и гипобласта приводят к образованию зародышевого щитка; по его средней линии в гипобласте клеточные интеркаляции формируют осевую мезодерму (хордомезодерму) – зачаток хорды. Аксиальная мезодерма, как следует из экспериментов по трансплантации материала эмбрионального щитка со стадии ранней гастрюлы, потенциально способна индуцировать вторичную эмбриональную ось. Следовательно, **эмбриональный щиток** в отношении его морфогенетической роли, его дорсального, маргинального положения в зародыше и судеб клеток, его составляющих, является полным эквивалентом области организатора Шпемана земноводных.

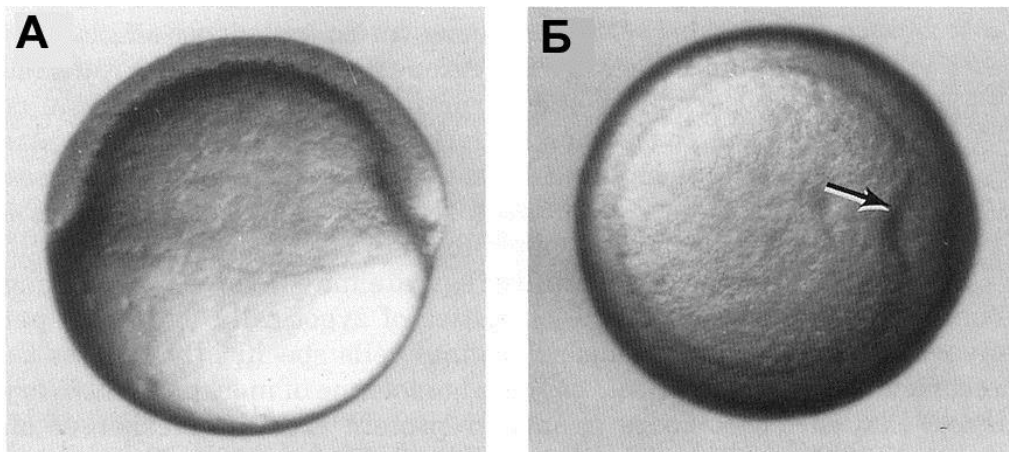
Вскоре после образования зародышевого щитка происходит разделение мезэндодермы на мезодерму и лежащий на перибласте слой эндодермы.

Начало гастрюляции у *Danio*



На фото зародыши на стадии 50% обдукции (5,25 час). А – вид сбоку, Б – вид с анимального полюса. Хорошо виден кольцевой контур (стрелка), представляющий собой кольцевое утолщение бластодермы на краю обрастания. Это утолщение – результат интернализации краевых клеток подповерхностного слоя бластодермы

Стадия «зародышевого щитка»



К 6 ч п/о у зародышей Данио можно видеть компактный участок (стрелка) зародышевого кольца, разрастающийся в направлении ан. полюса. Это утолщение отмечает будущую дорсальную сторону, а направление его роста соответствует будущей переднезадней оси зародыша.

ЗАКЛЮЧИТЕЛЬНЫЕ ОБОБЩЕНИЯ О ГАСТРУЛЯЦИИ У КОСТИСТЫХ РЫБ

1. Особенности организации обособленножелткового яйца Костистых рыб (КР) сказываются не только на характере дробления, они проявляются также в строении зародыша на стадии бластулы, в специфике интернализации поверхностных клеток при гастрюляции

2. У зародышей КР нет бластоцеля, в привычном смысле слова, а бластопор представлен одной протяженной губой в виде кольца по периметру бластодермы

3. Костистые рыбы демонстрируют несколько способов интернализации, все они ведут к формированию более или менее консолидированного нижнего слоя клеток гастрюлы – гипобласта (мезэнтодермы).

4. У КР не встречается инвагинация как способ интернализации. На стадиях, непосредственно предшествующих гастрюляции и в ходе её в поверхностном слое отсутствуют бокаловидные (бутылковидные) клетки.

5. Из способов интернализации чаще других отмечают инволюцию.

6. При этом первой вдоль будущей продольной оси погружается небольшая совокупность пограничных клеток, образующая прехордальную пластинку, за ней движутся клетки будущей хорды.

7. Вскоре после подворачивания внутрь клетки гипобласта диссоциируют, покидают и ранее не сильно спаянный слой, превращаясь в типичную мезенхиму. Поэтому, по-видимому, правильнее считать, что гастрюляционная интернализация у КР есть инволюция, переходящая в ингрессию.

8. Однако у некоторых групп рыб (например, у Лососевых) образование гипобласта происходит путем ингрессии или деляминации клеток из поверхностного слоя, несмотря на «щель Браше».

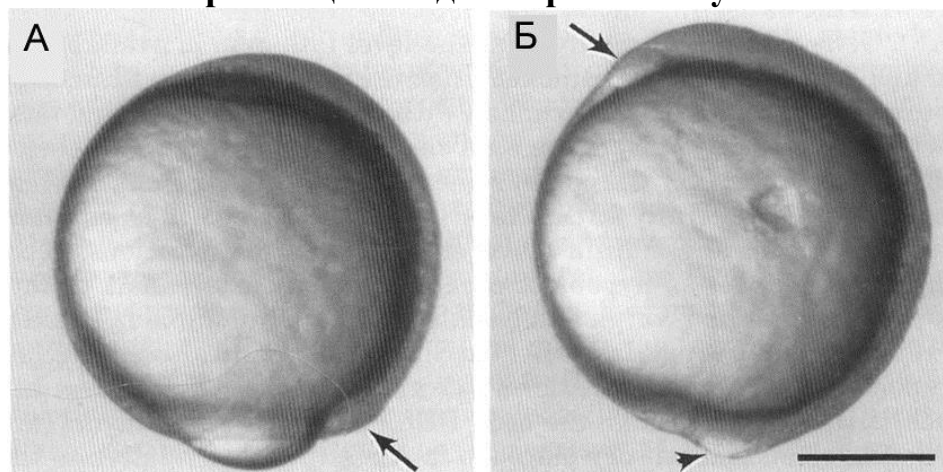
9. Начиная со второй половины гаструляции, к интернализации добавляются движения латеро-медиальной конвергенции, обеспечивающие аккумуляцию клеток в дорсальной области вдоль переднезадней оси тела и одновременно удлинение этой оси.

10. У гаструлы КР нет гастростома (архентерона) и, следовательно, нет и первичной кишки, а есть лишь тонкий слой дефинитивной энтодермы.

Таким образом, гаструляция у костистых рыб совершается без участия бутылковидных клеток, без образования бластопора и, кроме того, у костистых рыб она не приводит к формированию кишечной трубки. В конце гаструляции основные зачатки у КР (*Danio* в частности) имеют вид пластинок, распластанных на желтке.

Образование осевого комплекса зачатков (нотогенез) у *Teleostei*

Завершающие стадии обрастания у *Danio*



А – стадия 90% обдукции («желточная пробка»); **Б** – обрастание завершилось, наконечник стрелки показывает хвостовой бугорок (хвостовую почку); стрелка отмечает зачаток железы вылупления в головном отделе

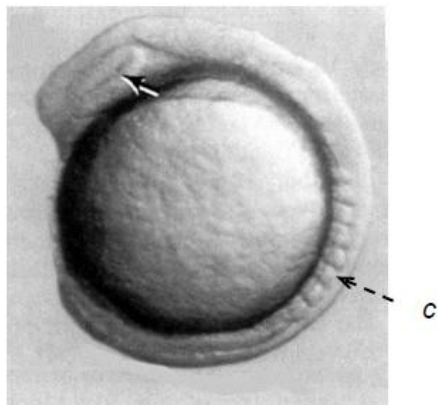
РАЗВИТИЕ МЕЗОДЕРМЫ У КОСТИСТЫХ РЫБ

Сегментация параксиальной мезодермы (сомитогенез) никак не связана с прогрессом обдукции (эпиболии). Например, у *Danio rerio* первые сомиты образуются сразу после завершения обрастания желтка, у зародышей лососёвых к моменту закрытия желточной пробки в теле насчитывают уже около 30 пар сомитов. Сомиты возникают последовательно один за другим в переднезаднем направлении. Первые несколько пар сомитов формируются быстрее (у Данио в среднем через 20 минут), последующие образуются с интервалом 30 минут на сомит. Оформление каждого сомита сопровождается эпителизацией его поверхностного слоя клеток. Эпителий окружает сердцевину из клеток мезенхимной организации. Подавляющее большинство внутренних клеток в каждом сомите будут формировать миотом или мускульный сегмент. Миотомы в ходе развития сохраняют метамерную организацию. Вскоре после своего образования миотомы приобретают характерную форму

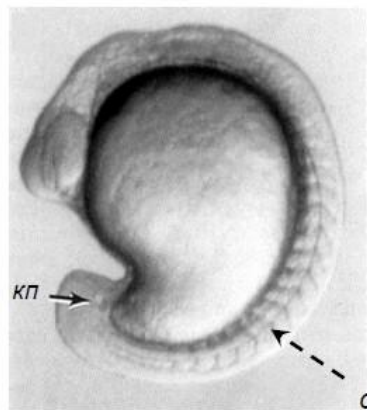
шевронов. Соседние миотомы отделены друг от друга поперечными миосептами из соединительной ткани.

Хорда также дифференцируется в переднезаднем направлении. Некоторые из её клеток вакуолизируются и набухают, превращаясь в структурные элементы этого органа. Другие клетки позже формируют футляр в виде эпителиального монослоя, окружающего орган.

Сомитогенез у *Danio rerio*

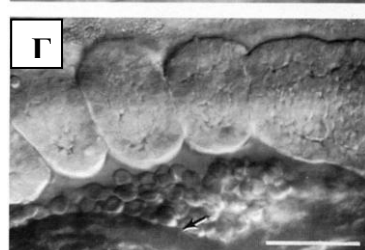
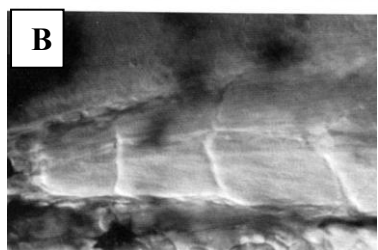
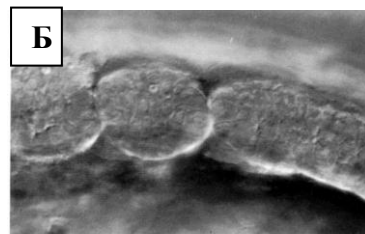


Стадия 8 пар сомитов



Стадия 15 пар сомитов

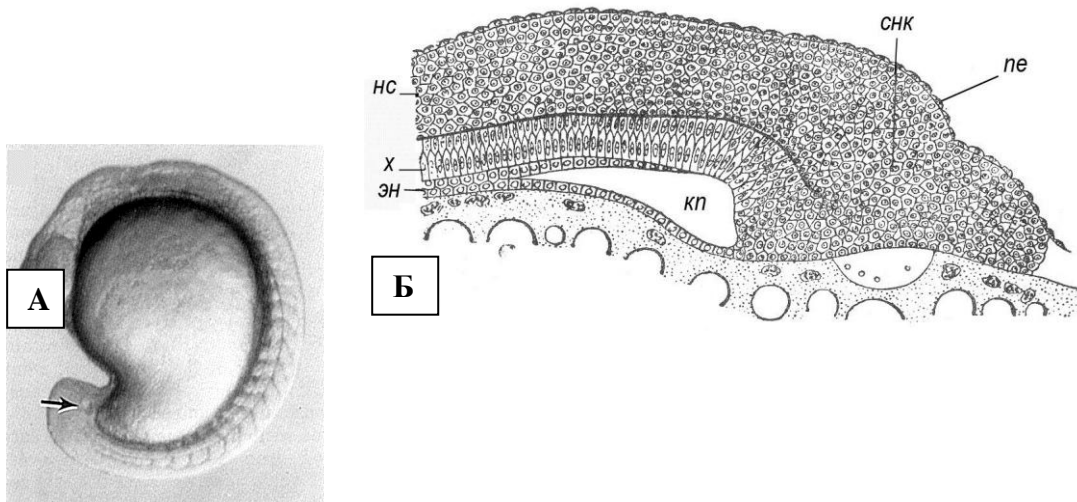
Морфогенез сомитов у *Danio*



Морфогенез сомитов (вид с левой стороны, спина обращена вверх, передний конец слева). **А:** передние (1–3) сомиты у зародыша на 9-сомитной стадии (13,5 ч). **Б:** задние (8–9) сомиты у того же зародыша. Десятый сомит только начинает оформляться и представляет собой округлый участок сегментарной пластинки параксиальной мезодермы. **В:** миотомы 1–3, развившиеся из первых трех сомитов (ср. с А). Стадия 30 ч п/о. Заметны поперечные и продольная миосепты и дифференцированные миофибриллы, вытянутые на всю длину миотома. При большем увеличении хорошо видна их поперечная исчерченность. Задние миотомы имеют более выраженную форму

шевронов. Г: задние три сомита на 19–сомитной стадии (сопоставить с Б). 20-й сомит, отделяющийся от сегментарной пластинки, выглядит более эпителизованным, чем такой же сомит на более ранней стадии. Передний (17-й) сомит из представленной группы уже имеет форму шеврона. Сомиты лежат над развивающимися клетками кровяных островков, расположенными выше зачатка пронефрического протока (показан стрелкой), который на этой стадии еще не имеет центрального просвета. Сомиты, созревая, превращаются в миотомы и значительно вытягиваются вдоль переднезадней оси, поэтому уже через 24 ч п/о 17-й миотом оказывается над окончанием пронефрического протока, а к концу эмбриогенеза в том же положении оказывается 15-й миотом.

Концевой отдел тела раннего зародыша *Teleostei*



А. Зародыш *Danio rerio* на стадии 15 пар сомитов. Задняя оконечность тела на этой стадии представлена утолщенной несегментированной массивной областью, заметно выступающей за пределы общего контура тела. Примечательной чертой этой области у зародышей *Teleostei* является *купферов пузырек* (стрелка), По Kimmel et al. (1995). Б. Изображение сагиттального среза концевой отдела тела зародыша ручьевой форели, *Salmo fario* на стадии перед замыканием желточной пробки. кп – купферов пузырек; нс – нейральный зачаток; пе – перидерма; снк – концевое скопление недифференцированных клеток; х – хорда; эн – кишечная энтодерма.

Формирование кишечной трубки у *Danio rerio*

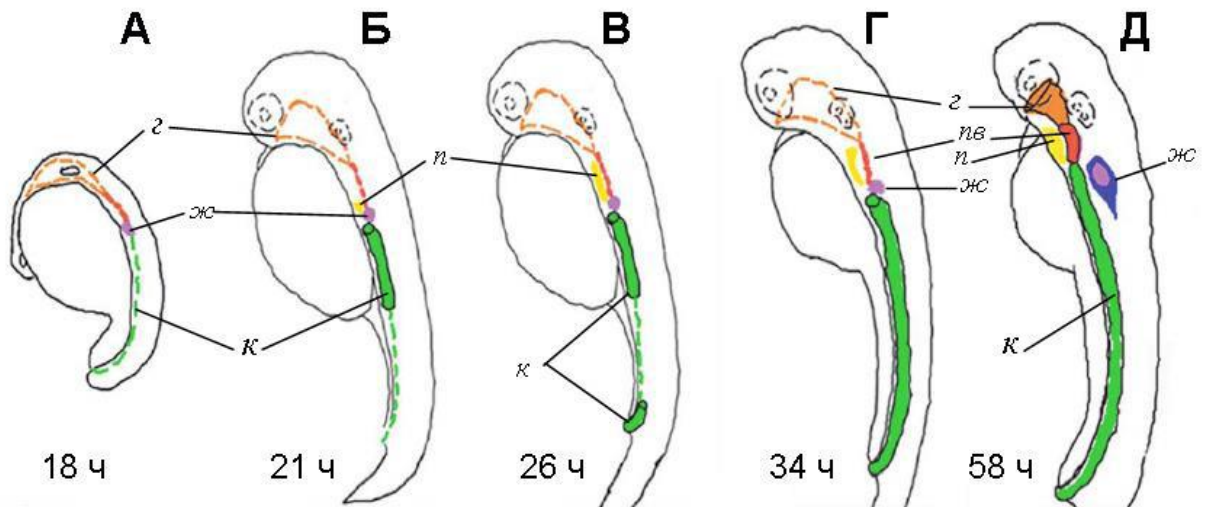
Кишечная энтодерма становится морфологически различимой в начале сегментации. Причем, вначале лишь немногие из разрозненных клеток можно определить как энтодермальные исключительно по их положению вдоль средней линии и по их контактам с перибластом. С течением развития количество этих клеток увеличивается, они располагаются компактно, приобретая вид эпителиальной пластинки. В дальнейшем в передних отделах тела (до уровня будущей печени) энтодермальная пластинка начинает отделяться от перибласта. В области будущего жаберного отдела пластинка образует шесть

пар боковых выростов, в которых вскоре появляются полости. Это жаберные карманы. Обособление энтодермальной пластинки сопровождается врастанием между нею и перибластом мезенхимы, из которой будет формироваться эндокард сердца. Затем в эту зону прорастают большие участки спланхнотомов в виде полых мешков, сливающихся друг с другом, образуя перикард и миокард.

Одновременно происходят реаранжировки клеток энтодермальной пластинки, в результате которых клетки медиальной группы вначале выстраиваются в виде веера, который постепенно преобразуется в розетку с центральным каналом (★). Этот центральный просвет постепенно расширяется, и компактный вытянутый вдоль тела зародыша зачаток превращается в кишечную трубку.

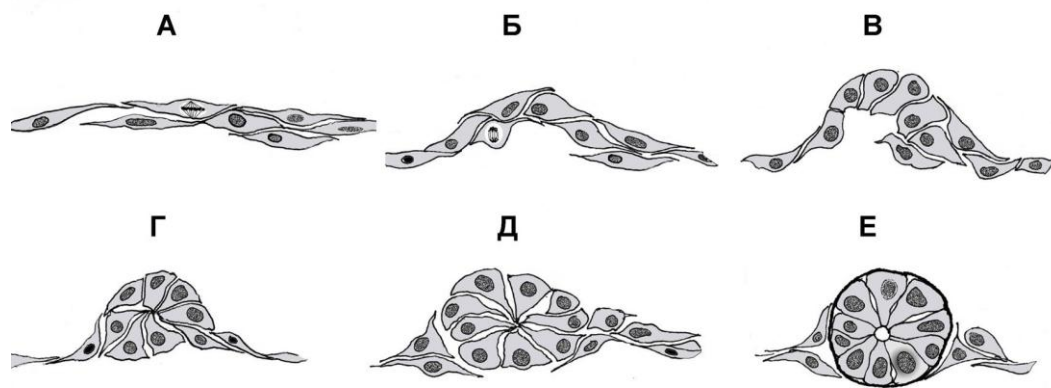
Одна из примечательных особенностей нотогенеза Костистых рыб состоит в том, что элементы рostrального отдела пищеварительной системы (глотка и пищевод) возникают и оформляются в трубчатые структуры позднее и отдельно от первичной кишки и, следовательно, не являются первоначально её частями. Их смыкание с кишкой происходит уже после вылупления в процессе разрастания кишечной трубки в переднем направлении (★).

Схема морфогенеза пищеварительной системы *Danio rerio*



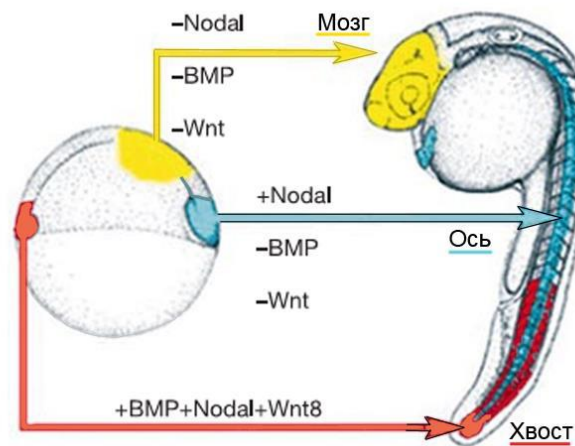
(А) Локализация клеток – предшественников глотки (г – оранжевый), поджелудочной железы (ж – пурпурный) и кишки (к – зелёный) на стадии 18 п.с. (18 часов после оплодотворения) может быть определена только по экспрессии генов–маркеров. (Б) На стадии 21 час после оплодотворения кишка сформировалась и может быть определена область локализации клеток–предшественниц печени (п – желтый). (В) Через пять часов образуется задняя кишка. (Г) К 34 часам развития произошло соединение двух фрагментов кишечной трубки, передний участок которой к этому времени достигает области почки грудного плавника; но оформленные зачатки глотки и пищевода еще отсутствуют. (Д) Через 58 часов после оплодотворения глотка, пищевод (пв – красный) и разросшаяся кишка соединяются в единую структуру.

Поляризация и реаранжировки энтодермальных клеток при формировании кишечной трубки у зародышей *Danio rerio*



(А) Слой клеток кишечной энтодермы на стадии 14 пар сомитов; (Б) Наслоение клеток энтодермы в медиальной зоне (стадия 16 п.с.); (В) Начинаяющаяся апико-базальная поляризация клеток и смыкание боковых участков пластинки (стадия 18 п.с.); (Г) и (Д) Замыкание краев двухслойной пластинки в цилиндрический тяж (стадии 22 и 26 п.с.); (Е) Завершение эпителизации (появление базальной мембраны) и центрального просвета кишечной трубки (стадия 34 пары сомитов).

Молекулярная природа «организатора» хвоста у *Danio*



Спецификация отделов тела зародыша *Danio* определяется уже на стадии зародышевого щитка путями сигналинга BMP, Nodal и Wnt. Формирование головы есть результат подавления всех трех путей (BMP, Nodal и Wnt). Образование туловищной оси (прехордальной пластинки, хордомезодермы и нейральной трубки туловища) есть следствие ингибирования BMP, Wnt и стимуляции Nodal. Развитие хвоста зависит от активирования всех трёх путей сигналинга.

48 часов после оплодотворения – вылупление *Danio rerio*



Тема: **БИОХИМИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ КРОВИ РЫБ**

Кровь является чувствительным и информативным индикатором состояния организма, быстро реагирующим на изменения экзогенных и эндогенных факторов и отражающим влияние как на отдельно взятую особь, так и на популяцию в целом. Динамика биохимических показателей может служить маркером состояния организма рыб в искусственных и естественных водоёмах, характеризовать качество и количество питания, плотность заселения, адаптивные способности рыб, интенсивность действия антропогенных факторов. Верхнее звено в пищевой цепи водоёма, активно перемещающиеся животные – рыбы, хороший индикатор усредненной токсичности всего района. В связи с постоянно растущей антропогенной нагрузкой и развитием аквакультуры растёт актуальность разработки и внедрения новых высокочувствительных методов исследования, накопления информации и создания базы данных биохимических показателей рыб.

Кровь для исследования у рыб берется из сердца, хвостовой артерии, культи хвоста или жаберных вен. Выбор способа взятия крови зависит от размера рыбы и объема, необходимого для анализа.

Взятие крови проводят, предварительно сняв чешую, удалив слизь и обработав кожу 70 %-м спиртом.

1. При взятии крови из сердца, место укола находится в середине отрезка, соединяющего основание грудных плавников (у форели) и чуть выше этой точки – у карповых рыб. Иглу вводят в место укола, под углом 45°, относительно фронтальной плоскости.

2. При взятии крови из хвостовой артерии место укола находится в точке, образованной при условном пересечении средней линии и линии,

идушей перпендикулярно от анального отверстия у сеголетков, и от заднего края анального плавника – у карповых рыб старшего возраста.

3. При взятии крови из культи хвоста, срезают спинной и анальный плавники, удаляют чешую, слизь, протирают кожу спиртом, затем отсекают хвостовой стебель по медиальной линии позади анального плавника и собирают кровь в стерильную посуду.

4. Взятие крови возможно из жаберных вен. Предварительно удаляют жаберную крышку и вводят инъекционную иглу в вену, у основания одной из жаберных дуг.

Для биохимического исследования используется сыворотка крови. Для получения сыворотки кровь из шприца после забора ее переливают в пробирку. При этом необходимо кровь из шприца переливать медленно по стенке пробирки для предотвращения гемолиза, т. е. разрушения эритроцитов. После помещения крови в пробирку ее маркируют.

Для получения сыворотки кровь необходимо подвергнуть центрифугированию. После центрифугирования сыворотка оказывается сверху, эритроцитарная масса – снизу. Пробирку из центрифуги следует вынимать крайне осторожно во избежание взмучивания эритроцитарной массы. Сыворотку откачивают из пробирки шприцем с иглой или с помощью дозатора. Захват эритроцитов при этом недопустим, так как при биохимическом исследовании будут получены искаженные данные.

После получения сыворотку подвергают исследованию при наличии биохимической лаборатории. При отсутствии ее сыворотку замораживают, затем отправляют в лабораторию для исследования. Размораживание сыворотки в процессе транспортировки недопустимо.

Биохимические исследования

В условиях интенсивного индустриального выращивания рыб одним из критериев соблюдения физиологически обоснованных технологий выращивания является оценка функционального состояния производителей, а именно обмена веществ. Высокие плотности посадки, напряженные гидрохимические условия, длительное голодание в период зимовки, а также рыбоводные манипуляции в нерестовый период и сопутствующие стресс-факторы могут быть основными причинами нарушений обмена веществ в организме производителей.

Наиболее объективным и достоверным для оценки состояния здоровья живого организма является определение лабораторными методами биохимических показателей крови, характеризующих состояние разных видов обмена веществ в организме.

Определение белка в сыворотке крови рыб имеет важное значение для выявления нарушений физиологического состояния, особенно у производителей, так как по этому показателю возможно подтвердить или исключить гипопроотеинемию, которая может наблюдаться у самок и самцов после зимовки из-за длительного голодания.

Следует обратить внимание на то, что этот показатель у самцов-производителей выше, чем у самок. Это может объясняться более интенсив-

ной мышечной нагрузкой в преднерестовый и нерестовый периоды, в результате чего содержание белка может увеличиться до 10 %.

Определение концентрации **аминотрансфераз (АсАТ, АлАТ)** – ферментов, играющих важную роль в азотистом обмене – необходимо для оценки обменных процессов в живом организме, а также для тестирования работы печени, которая играет важную роль в процессе полового созревания осетровых. Как известно из медицинских справочников, значения активности ферментов, полученные разными методами, могут существенно отличаться друг от друга, даже если они выражены в одних и тех же единицах активности. При этом для каждого вида методик разработаны отдельные нормы, которых имеется несколько десятков. Для рыб, а тем более для осетровых, такого количества норм не существует. Поэтому большое значение (как и в медицинской клинической практике) имеет соотношение активности АсАТ / АлАТ в сыворотке крови (коэффициент де Ритиса).

Важную роль в обеспечении энергетики организма играют циркулирующие в крови углеводы. В отличие от высших водных позвоночных, у рыб колебания сахара в крови очень велики, что связано с несовершенным механизмом регуляции. Определение концентрации **глюкозы** в крови рыб необходимо для оценки углеводного обмена, синтетической и антитоксической функций печени, для выявления гипо- или гипергликемии. Высокий уровень глюкозы можно рассматривать как индикатор стресс-реакции рыб. Возможно, что таким образом организм рыб реагирует на рыбоводные манипуляции, а также на подъем температуры. В стрессовых ситуациях у рыб под действием кортизола происходит активация глюкозы, которая обеспечивает увеличение энергетического обмена, что помогает организму рыбы противостоять напряжению (стрессу). Таким образом, концентрацию глюкозы в крови рыб можно рассматривать как индикатор стресса, однако, принимая во внимание, что глюкоза крови не является для рыб жесткой константой гомеостаза, этот показатель нельзя признать универсальным при стрессированности рыбы. Кроме того, в период нереста в крови производителей осетровых рыб происходят закономерные изменения содержания глюкозы и холестерина в сыворотке крови, обеспечивающие необходимый уровень метаболизма и свидетельствующие о высокой адаптационной пластичности этих рыб.

Кальций крови, как один из маркеров оценки зрелости производителей рыб, связывает гликолипопротеиды, а именно белок желточных гранул ооцита – вителлогенин. По результатам изменения концентрации кальция в крови производителей можно делать выводы об интенсивности синтеза вителлогенина у самок рыб, так как степень зрелости ооцитов, концентрация вителлогенина и кальция находятся в довольно тесной взаимосвязи между собой.

Определение концентрации **фосфора** в крови важно для подтверждения или исключения гипофосфатемии или гиперфосфатемии, что может происходить при нарушении обменных процессов.

При биохимических исследованиях в полученной сыворотке крови определяют активность аспаратаминотрансферазы (AST), щелочной фосфатазы (ALP), аланинаминотрансферазы (ALT), γ -глутамилтрансферазы (GGT),

холестерина (Chol), лактатдегидрогеназы (LDH), триглицеридов (TG), кальция (Ca), общего белка (TP), фосфора (P), мочевой кислоты (UA). Все исследования проводились при температуре 25°C с использованием реактивов фирмы «Cormay».

Биохимические исследования проводятся на свежей сыворотке без следов гемолиза. Антикоагулянты не используют.

Активность определения **LDH-1** основана на кинетическом методе, рекомендованном Немецким обществом клинической химии (DGKC), заключающемся в измерении скорости изменения коэффициента поглощения, которая прямо пропорциональна активности LDH-1. В исследованиях используют реактивы фирмы «Cormay» (Liquick Cor-HBDH 30), включающие реактивы 1-HBDH и 2-HBDH, которые осторожно смешивают для приготовления рабочего реактива в соотношении 4:1. Определение активности LDH-1 проводят при температуре 25°C и длине волны $\lambda = 340$ нм. В ходе исследований используют метод Sample Star. Для исследования одной пробы готовят рабочий раствор в объеме 1000 мкл, который подогревается до температуры определения. Затем добавляется исследуемый материал в объеме 20 мкл. После тщательного перемешивания по истечении 1 мин отсчитывают коэффициент поглощения относительно воздуха или дистиллированной воды. Измерения повторяют после очередных 1, 2, 3 мин и подсчитывают среднее изменение коэффициента поглощения за минуту. Полученное значение умножают на величину $F = 8095$.

Активность **GGT** в сыворотке крови определяют на основании кинетической реакции L-γ-глутамил-3-карбокси-4-нитроанилида. Скорость образования 5-амино-2-нитробензоата, измеряемая колориметрически, прямо пропорциональна активности γ-глутамилтрансферазы. В исследованиях используют реактивы фирмы «Cormay» (Liquick Cor-GGT 30), включающие реактивы 1-GGT и 2-GGT, которые осторожно смешивают для приготовления рабочего реактива в соотношении 4:1. Определение активности GGT проводят при температуре 25 и 37°C и длине волны $\lambda = 405$ нм. В ходе исследований используют метод Sample Star. Для исследования одной пробы готовят рабочий раствор в объеме 1000 мкл, который подогревается до температуры определения. Затем добавляют исследуемый материал в объеме 100 мкл. После тщательного перемешивания по истечении 1 мин отсчитывают коэффициент поглощения относительно воздуха или дистиллированной воды. Измерения повторяют после очередных 1, 2, 3 мин и подсчитывают среднее изменение коэффициента поглощения за минуту. Полученное значение умножают на величину $F = 1158$.

Активность определения **LDH** основана на кинетическом методе, рекомендованном Немецким обществом клинической химии, заключающемся в измерении скорости изменения коэффициента поглощения, которая прямо пропорциональна активности LDH. В исследованиях используют реактивы фирмы «Cormay» (Liquick Cor-LDH 30), включающие реактивы 1-LDH и 2-LDH, которые осторожно смешивают для приготовления рабочего реактива в соотношении 4:1. Определение активности LDH проводят при температуре

25°C и длине волны $\lambda = 340$ нм. В ходе исследований используют метод Sample Star. Для исследования одной пробы приготавливают рабочий раствор в объеме 1000 мкл, который подогревается до температуры определения. Затем добавляют исследуемый материал в объеме 20 мкл. После тщательного перемешивания по истечении 1 мин отсчитывают коэффициент поглощения относительно воздуха или дистиллированной воды.

Измерения повторяют после очередных 1, 2, 3 мин и подсчитывают среднее изменение коэффициента поглощения за минуту. Полученное значение умножают на величину $F = 8095$.

Оптимизированный и модифицированный метод определения активности **AST** основан на рекомендациях Международной федерации клинической химии (IFCC), без активации пиридоксальфосфатом. Скорость изменения коэффициента поглощения прямо пропорциональна активности AST. В исследованиях используют реактивы фирмы «Cormay» (Liquick Cor-ASAT 60), включающие реактивы 1-ASAT и 2-ASAT, которые осторожно смешивают для приготовления рабочего реактива в соотношении 4:1. Определение активности AST проводят при температуре 25 и 37°C и длине волны $\lambda = 340$ нм. В ходе исследований используют метод Sample Star. Для исследования одной пробы приготавливают рабочий раствор в объеме 1000 мкл, который подогревается до температуры определения. Затем добавляют исследуемый материал в объеме 100 мкл. После тщательного перемешивания по истечении 1 мин отсчитывают коэффициент поглощения относительно воздуха или дистиллированной воды. Измерения повторяют после очередных 1, 2, 3 мин и подсчитывают среднее изменение коэффициента поглощения за минуту. Полученное значение умножают на величину $F = 1746$.

Активность определения **ALP** основана на кинетическом методе, рекомендованном Международной федерацией клинической химии. Скорость образования п-нитрофенола измерялась колориметрически, она прямо пропорциональна активности ALP. В исследованиях используют реактивы фирмы «Cormay» (Liquick Cor-ALP 30), включающие реактивы 1-ALP и 2-ALP, которые осторожно смешивают для приготовления рабочего реактива в соотношении 4:1. Определение активности ALP проводят при температуре 25 и 37°C и длине волны $\lambda = 405$ нм. В ходе исследований используют метод Sample Star. Для исследования одной пробы приготавливают рабочий раствор в объеме 1000 мкл, который подогревается до температуры определения. Затем добавляют исследуемый материал в объеме 20 мкл. После тщательного перемешивания по истечении 1 мин отсчитывают коэффициент поглощения относительно воздуха или дистиллированной воды. Измерения повторяют после очередных 1, 2, 3 мин и подсчитывают среднее изменение коэффициента поглощения за минуту. Полученное значение умножают на величину $F = 2764$.

Оптимизированный и модифицированный метод определения активности **ALT** основан на рекомендациях Международной федерации клинической химии, без пиридоксальфосфата. Скорость изменения оптической плотности прямо пропорциональна активности ALT. В исследованиях ис-

пользуют реактивы фирмы «Cormay» (Liquick Cor-ALAT 60), включающие реактивы 1-ALAT и 2-ALAT, которые осторожно смешивают для приготовления рабочего реактива в соотношении 4:1. Определение активности ALT проводят при температуре 25 и 37°C и длине волны $\lambda = 340$ нм. В ходе исследований используют метод Sample Star. Для исследования одной пробы готовят рабочий раствор в объеме 1000 мкл, который подогревается до температуры определения. Затем добавляют исследуемый материал в объеме 100 мкл. После тщательного перемешивания по истечении 1 мин отсчитывают коэффициент поглощения относительно воздуха или дистиллированной воды. Измерения повторяют после очередных 1, 2, 3 мин и подсчитывают среднее изменение коэффициента поглощения за минуту. Полученное значение умножают на величину $F = 1746$.

Метод определения **общего белка (TP)** основан на биуретовой реакции. Пептидные связи белка в щелочной среде реагируют с ионами меди, образуя окрашенный комплекс. Интенсивность образовавшейся окраски прямо пропорциональна количеству пептидных связей, а тем самым концентрации белка. В исследованиях используют реактивы фирмы «Cormay» (Liquick Cor-TOTAL PROTEIN 60). Определение концентрации TP проводят при температуре 25 и 37°C и длине волны $\lambda = 546$ нм.

Метод определения концентрации **альбумина (Alb)** основан на образовании с бромкрезоловым зеленым в сукцинатном буфере (в кислой среде) окрашенного комплекса. Абсорбция образовавшегося комплекса измеряется при длине волны $\lambda = 630$ нм и температуре 25 и 37 °C. В исследованиях используют реактивы фирмы «Cormay» (Liquick Cor-ALBUMIN 60).

Метод определения концентрации **общего холестерина (Chol)** - колориметрический, энзиматический с эстеразой и оксидазой холестерина. Интенсивность окраски прямо пропорциональна концентрации холестерина. В исследованиях используют реактивы фирмы «Cormay» (Liquick Cor-CHOL 60). Определение концентрации Chol проводят при температуре 25 и 37°C и длине волны $\lambda = 500$ нм.

Метод определения концентрации **неорганического фосфора** основан на реагировании ионов фосфора с молибдат-ионами в кислой среде с образованием комплекса фосформолибдата. Коэффициент поглощения образовавшегося комплекса измеряется при длине $\lambda = 340$ нм и температуре 25 и 37°C. В исследованиях используют реактивы фирмы «Cormay» (Liquick Cor-PHOSPHORUS 30).

Тема: **ОСНОВЫ МЕТОДИКИ ПЦР**

Полимеразная цепная реакция (ПЦР) – экспериментальный метод молекулярной биологии, позволяющий добиться значительного увеличения малых концентраций определенных фрагментов нуклеиновой кислоты (НК) в биологическом материале (пробе).

Открытию полимеразной цепной реакции предшествовало развитие молекулярнобиологических технологий.

В 1869 г. И. Мишером была открыта ДНК. Биологическая функция нового вещества была не ясна.

В 1944 г. ученые О. Эвери, К. Маклеод и М. Маккарти провели ряд экспериментов по трансформации бактерий и доказали, что за трансформацию (приобретение болезнетворных свойств безвредной культурой в результате добавления в нее мертвых болезнетворных бактерий) отвечают выделенные из пневмококков ДНК.

Вплоть до 50-х годов XX века точное строение ДНК и способ передачи наследственной информации оставались неизвестными, хотя и было доказано, что ДНК состоит из нескольких цепочек, состоящих из нуклеотидов.

ДНК – полимерная молекула, состоящая из повторяющихся блоков – нуклеотидов. Каждый нуклеотид состоит из азотистого основания, сахара (дезоксирибозы) и фосфатной группы. Связи между нуклеотидами в цепи образуются за счет дезоксирибозы и фосфатной группы (фосфодиэфирные связи). В подавляющем большинстве случаев (кроме некоторых вирусов, содержащих одноцепочечную ДНК) макромолекула ДНК состоит из двух цепей, ориентированных азотистыми основаниями друг к другу.

В ДНК встречается четыре вида азотистых оснований (аденин, гуанин, тимин и цитозин). Азотистые основания одной из цепей соединены с азотистыми основаниями другой цепи водородными связями согласно принципу комплементарности: аденин соединяется только с тимином, гуанин – только с цитозином.

Каждая цепь служит матрицей при синтезе новой цепи, а последовательность в синтезируемой цепи задается последовательностью комплементарных оснований цепи-матрицы. Асимметричные концы цепи ДНК называются 3' (три-штрих) и 5' (пятьштрих). Полярность цепи играет важную роль при синтезе ДНК (удлинение цепи возможно только путем присоединения новых нуклеотидов к свободному 3'-концу).

Количественные соотношения между различными типами азотистых оснований в составе нуклеотидов ДНК были сформулированы в 1949–1951 гг. группой биохимика Э. Чаргаффа и получили название «правила Чаргаффа». Суть этих правил заключалась в следующем:

1. Количество аденина (А) равно количеству тимина (Т), а гуанина (Г) – цитозину (Ц): $A = T, G = C$.

2. Количество пуринов равно количеству пиримидинов: $A + G = T + C$.

Правила Чаргаффа наряду с данными рентгеноструктурного анализа сыграли решающую роль в расшифровке структуры ДНК Дж. Уотсоном и Ф. Криком в 1953 году.

В 1955 г. А. Корнберг открыл фермент, который назвал *ДНК-полимеразой*. Этот фермент способен удлинять цепь ДНК, присоединяя нуклеотиды к ее 3'-концу. В искусственных условиях фермент катализирует реакцию достраивания участка искомой ДНК от затравки (праймера), которая комплементарно связана с цепью ДНК (матрицей). Раствор, в котором про-

исходит эта реакция, должен содержать нуклеозидтрифосфаты (дНТФ), используемые в качестве строительных блоков.

В 1971 г. Х. Клеппе и соавторы рассмотрели данные, касающиеся состава ингредиентов реакционной смеси, и принципы использования коротких искусственно синтезированных молекул ДНК–праймеров для получения новых копий ДНК.

Однако возможность использования ПЦР в плане наработки большого количества копий нуклеиновых кислот еще не рассматривалась. Это было связано с техническими трудностями, обусловленными необходимостью трудоемкого синтеза праймеров, и нестабильностью фермента. В начале использования метода ПЦР после каждого цикла нагревания и охлаждения ДНК–полимеразу приходилось добавлять в реакционную смесь, так как она быстро инактивировалась при высокой температуре, необходимой для разделения цепей спирали ДНК. Процедура была очень неэффективной, требовала много времени и фермента.

В 1975 г. Т. Брок и Х. Фриз открыли *Thermus aquaticus* – граммотрицательную палочковидную экстремально термофильную бактерию, а в 1976 г. из нее была впервые выделена *Taq–полимераза*. Преимуществом данного фермента была способность стабильно работать при повышенных температурах (оптимум 72–80°C).

В 1983–1984 гг. К. Мюллис провел ряд экспериментов по разработке ПЦР и первым начал использовать *Taq–полимеразу* вместо неустойчивой к высоким температурам ДНК–полимеразы. Это позволило ускорить работы по разработке полимеразной цепной реакции. Кроме того, К. Мюллис вместе с Ф. Фалуном разработали алгоритм циклических изменений температуры в ходе ПЦР.

Таким образом, сформировался принцип использования ПЦР как метода *амплификации in vitro* заданных фрагментов ДНК с полностью или частично известной последовательностью.

Результатом открытия ПЦР стало почти немедленное практическое применение метода. В 1985 г. Саики с соавторами опубликовали статью, в которой была описана амплификация геномной последовательности β -глобина. С этого момента количество публикаций о применении ПЦР в своей работе стало увеличиваться в геометрической прогрессии.

Особенно бурное развитие метод ПЦР получил благодаря международной программе «Геном человека». Были созданы современные лазерные технологии секвенирования (расшифровки нуклеотидных последовательностей ДНК). Это в свою очередь способствовало значительному росту информационных баз данных, содержащих последовательности ДНК биологических объектов.

В настоящее время предложены различные модификации ПЦР, показана возможность создания тест–систем для обнаружения микроорганизмов, выявления точечных мутаций, описаны десятки различных применений метода.

Таким образом, открытие метода ПЦР стало одним из наиболее выдающихся событий в области молекулярной биологии за последние десятилетия. Это позволило поднять медицинскую диагностику на качественно новый уровень.

Механизм полимеразной цепной реакции

Для проведения ПЦР необходимо наличие в реакционной смеси (РС) ряда основных компонентов.

Праймеры – искусственно синтезированные олигонуклеотиды, имеющие, как правило, размер от 15 до 30 нуклеотидов, идентичные (комплементарные) противоположным концам противоположных цепей искомого участка ДНК–мишени. Служат затравкой для синтеза комплементарной цепи с помощью ДНК–полимеразы и играют ключевую роль в образовании и накоплении продуктов реакции амплификации.

Правильно подобранные праймеры обеспечивают специфичность и чувствительность тест–системы и должны отвечать ряду критериев:

➤ *быть специфичными.* Особое внимание уделяют 3'–концам праймеров, так как именно с них Таq–полимераза начинает достраивать комплементарную цепь ДНК. При недостаточной специфичности праймеров в процессе ПЦР будут образовываться продукты, которые, с одной стороны, могут быть идентифицированы как ложноположительный результат, а с другой стороны, на процессы их накопления будут расходоваться компоненты реакционной смеси, что приведет к значительной потере чувствительности реакции как таковой;

➤ *не должны образовывать димеры и петли* – устойчивые двойные цепи – при отжиге праймеров самих на себя или друг с другом;

➤ *область отжига праймеров должна находиться вне зон мутаций, делеций или инсерций* в пределах видовой или иной специфичности, взятой в качестве критерия при выборе праймеров. При попадании в такую зону не происходит отжига праймеров и, как следствие, возникает ложноотрицательный результат.

Таq–полимераза – термостабильный фермент, который обеспечивает достраивание 3'–конца второй цепи ДНК согласно принципу комплементарности.

Смесь дезоксинуклеотидтрифосфатов (дНТФ) – дезоксиаденозинтрифосфат (дАТФ), дезоксигуанозинтрифосфат (дГТФ), дезоксицитозинтрифосфат (дЦТФ) и дезокситимидинтрифосфат (дТТФ) – строительный материал, используемый Таq–полимеразой для синтеза второй цепи ДНК.

Буфер – смесь катионов и анионов в определенной концентрации, обеспечивающей оптимальные условия для реакции, а также стабильное значение pH.

Анализируемый образец – подготовленный к внесению в реакционную смесь препарат, который может содержать искомую НК, например ДНК микроорганизмов, служащую мишенью для последующего многократного копирования. При отсутствии НК–мишени специфический продукт амплификации не образуется.

Дополнительные компоненты

Для удобства детекции и контроля эффективности амплификации в состав реакционной смеси могут быть включены дополнительные компоненты.

- **Положительный контроль**

Положительный контрольный образец (ПКО) представляет собой искусственно синтезированную олигонуклеотидную последовательность, строго соответствующую искомой. Соответственно, праймеры для ПКО и искомой мишени одинаковые, что позволяет удостовериться в работоспособности и сохранности компонентов РС, необходимых для нормального прохождения ПЦР.

- **Отрицательный контроль**

Отрицательный контрольный образец (ОКО) включает в себя все компоненты реакции, но вместо клинического материала или препарата НК вносится соответствующее количество деионизованной воды или экстракта, не содержащего исследуемую ДНК. Отрицательный контроль необходим для проверки компонентов реакции на отсутствие в них ДНК или клеток возбудителя вследствие контаминации и исключения учета ложноположительных результатов.

- **Внутренний контроль**

Препарат НК может содержать примеси ингибиторов, которые заметно снижают эффективность ПЦР, а в некоторых случаях могут приводить к полному отсутствию результатов исследования. Кроме того, возможны ошибки на этапе составления РС (например, не добавили какой-либо компонент или саму НК), несоблюдение температурного режима хранения наборов реагентов или отдельных их частей (например, размораживание и потеря активности ферментов) и ряд других технических моментов, которые напрямую влияют на результаты ПЦР. Поэтому становится необходимым контролировать ход амплификации в каждой пробирке с реакционной смесью. Для этого в состав РС вводят дополнительный *внутренний контроль* (ВК).

ВК – это искусственно сконструированный препарат ДНК или РНК, который имеет принципиально отличную от искомой олигонуклеотидную последовательность. Для ВК в состав РС вводят собственные, строго комплементарные праймеры.

Концентрация ВК в РС должна быть такой, чтобы не составлять конкуренции для амплификации даже единичных искомых молекул НК.

Наличие ампликонов ВК является свидетельством нормального прохождения реакции амплификации. Если ампликоны искомой НК отсутствуют, но не образовались также и ампликоны ВК, можно сделать вывод о технологических нарушениях либо о наличии в анализируемом образце нежелательных примесей. В любом случае результат реакции следует признать недостоверным.

ВК может быть использован не только непосредственно в составе РС для амплификации, но и для контроля качества выделения НК. Для этого его вводят в каждую пробирку с исходным или предварительно обработанным образцом, проводят через этап выделения и только потом добавляют в РС.

Введение ВК с *известной концентрацией* на этапе выделения особенно важно для контроля количественного ПЦР–анализа.

- **Специальные контроли**

Использование специальных контролей при постановке ПЦР позволяет решить ряд задач, в первую очередь касающихся оценки эффективности процесса амплификации и контроля специфичности полученных результатов, а также дает возможность реализовать подход к количественному анализу ДНК.

Принципиальным моментом является постановка специальных контролей при исследовании сложных многокомпонентных систем, таких как биоценозы, поскольку появляется возможность качественного и количественного анализа взаимодействия компонентов системы и характеристики их отношения к биотопу.

К специальным контролям можно отнести следующие:

- маркеры длин фрагментов ДНК;
- контроль фона;
- стандарты и калибраторы;
- контроль взятия материала (КВМ).

Маркеры длин фрагментов ДНК используются при детекции результатов ПЦР методом гель–электрофореза. Стандарты (маркеры) представляют собой фрагменты двухцепочечной ДНК строго определенной длины, позволяющие идентифицировать и охарактеризовать полосы, полученные в геле, и оценить результаты анализа с точки зрения их специфичности.

Контроль фона используется для ПЦР с флуоресцентными методами детекции результатов, причем данный тип контроля наиболее актуален для ПЦР с детекцией результатов по конечной точке.

Анализ уровней флуоресценции искомой мишени и фоновой флуоресценции позволяет установить некоторое пороговое значение и определить критерии достоверности положительного и отрицательного результатов ПЦР с детекцией результатов по конечной точке. Важно, что на величину фоновой флуоресценции могут повлиять: свойства меченых зондов; изменения концентрации отдельных компонентов реакционной смеси в зависимости от серии, режима и продолжительности хранения; свойства используемого пластика; особенности регистрирующей аппаратуры. Поэтому фоновые пробирики должны готовиться в соответствии с инструкцией к применяемому набору реагентов, рекомендациями производителя и к каждой новой серии наборов реагентов.

Стандарты и калибраторы наиболее часто используются при осуществлении количественного анализа методом ПЦР с детекцией результатов в режиме реального времени (см. ниже). Стандарт – произвольный фрагмент ДНК или РНК, ограниченный теми же праймерами, что и для искомой мишени. Известные концентрации стандарта соответствуют определенным значениям порогового цикла C_t (номер первого цикла, в котором происходит увеличение флуоресцентного сигнала репортерной группы по сравнению с уровнем фонового сигнала; его величина зависит от исходного количества

копий матрицы и от эффективности амплификации ДНК). Введение этого типа контролей предполагает построение калибровочного графика, из которого находят концентрацию искомой НК в исследуемом образце. Точность метода зависит от того, насколько условия ПЦР серии стандартов (прежде всего эффективность амплификации) близки к условиям ПЦР экспериментальных образцов.

Основные этапы ПЦР

Если в анализируемом образце присутствует искомая ДНК, то в процессе реакции амплификации с ней происходят изменения, которые обеспечиваются определенными температурными циклами. Каждый цикл амплификации состоит из трех этапов:

1. *Денатурация* – это переход ДНК из двухнитевой формы в однонитевую при разрыве водородных связей между комплементарными парами оснований противоположных цепей ДНК под воздействием высоких температур.

2. *Отжиг* – это присоединение праймеров к одноцепочечной ДНК-мишени. Праймеры подбирают так, чтобы они ограничивали искомый фрагмент ДНК и были комплементарны противоположным цепям ДНК. Отжиг происходит в соответствии с правилом комплементарности Чаргаффа. Если это условие не соблюдено, то отжига праймеров не происходит.

3. *Элонгация (синтез)*. После отжига праймеров Taq-полимераза начинает достраивание второй цепи ДНК с 3'-конца праймера с использованием дНТФ.

Температурный цикл амплификации многократно повторяется (30 и более раз). На каждом цикле количество синтезированных копий фрагмента ДНК удваивается.

Результатом циклического процесса является экспоненциальное увеличение количества специфического фрагмента ДНК, которое можно описать формулой:

$$A = M \cdot (2^n - 1) \sim 2^n,$$

где A – количество специфических (ограниченных праймерами) продуктов реакции амплификации;

M – начальное количество ДНК-мишеней;

n – число циклов амплификации.

Реальное значение эффективности отдельных циклов амплификации составляет, по некоторым данным, 78–97 %. Если в пробе присутствуют ингибиторы реакции, это значение может быть намного меньше, поэтому фактическое количество специфических продуктов амплификации лучше описывает формула:

$$A = M \cdot (1 + E)^n,$$

где E – значение эффективности реакции.

Таким образом, специфические фрагменты, ограниченные на концах праймерами, впервые появляются в конце второго цикла, накапливаются в геометрической прогрессии и очень скоро начинают доминировать среди продуктов амплификации.

Эффект плато

Процесс накопления специфических продуктов амплификации по геометрической прогрессии идет лишь ограниченное время, а затем его эффективность критически

падает – проявляется *эффект плато*.

Термин «эффект плато» используют для описания процесса накопления продуктов ПЦР на последних циклах амплификации, когда количество ампликонов достигает 0,3–1 пмоль.

На достижение эффекта плато влияют:

- ▶ утилизация субстратов (дНТФ и праймеров);
- ▶ стабильность реагентов (дНТФ и фермента);
- ▶ количество ингибиторов, включая пирофосфаты и ДНК–дуплексы;
- ▶ неспецифические продукты и праймер–димеры, конкурирующие за праймеры, дНТФ и полимеразу;
- ▶ концентрация специфического продукта за счет неполной денатурации при высокой концентрации ампликонов.

Методы выделения нуклеиновых кислот

Для подготовки пробы к постановке ПЦР используют различные методики выделения в зависимости от поставленных задач. Их суть заключается в экстракции (извлечении) нуклеиновых кислот (ДНК или РНК) из исследуемого материала и удалении или нейтрализации посторонних примесей.

Для выделения нуклеиновых кислот в рутинной лабораторной практике используют три наиболее распространенных подхода:

1. Экспресс–методы (используются для выделения ДНК) базируются на температурном лизисе клеток и последующем центрифугировании, в результате которого нерастворимые компоненты осаждаются на дне пробирки, а надосадочная жидкость (супернатант), содержащая ДНК, используется для проведения ПЦР.

Метод прост в использовании, занимает не более 10–15 минут, обеспечивает максимальный выход ДНК, но малоэффективен при работе с материалом, содержащим высокое количество примесей и ингибиторов ПЦР. Кроме того, метод не может быть использован для выделения РНК, так как РНКазы устойчивы к нагреванию.

При необходимости использования экспресс–методов со «сложными» образцами возможно введение дополнительных способов очистки и концентрации материала, например в случае избытка слизи в пробе (для мокроты и эякулята, бронхоальвеолярного лаважа, промывных вод бронхов, трахеального смыва, синовиальной и плевральной жидкости) целесообразными являются предварительная отмывка и обработка муколитиками.

Более эффективным методом выделения и очистки нуклеиновых кислот (НК) при работе с таким материалом может быть использование сорбентов или сильных хаотропных агентов.

2. Сорбентные методы выделения – дифференциальная сорбция нуклеиновых кислот (допустимо выделение как ДНК, так и РНК) на твердом носителе (чаще всего: силикагель с повышенным отрицательным зарядом или

модифицированной поверхностью, стеклянные бусы, диатомовая земля, стеклянное «молоко» и т. д.). Нуклеиновая кислота обратимо связывается со стеклом в присутствии высокой концентрации хаотропных солей (например гуанидин тиоцианат). Ингибиторы и другие компоненты клинического материала остаются в растворе. Кроме хаотропных солей в лизирующем буфере чаще всего присутствуют детергенты, которые способствуют растворению и лизису белков. С помощью центрифугирования силика с НК осаждается, а супернатант с ингибиторами ПЦР удаляется. Серия последующих отмывок обеспечивает получение высокоочищенного препарата НК.

Актуальная на данный момент модификация сорбентного метода – выделение на магнитных частицах в ручном или автоматическом режимах. Использование магнитных твердых носителей имеет ряд преимуществ по сравнению с немагнитными сепарационными методами.

Для процесса выделения используются магнитные носители (синтетические полимеры, биополимеры, пористое стекло, оксид железа с модифицированной поверхностью и другие) с высокой аффинностью к конкретной нуклеиновой кислоте. Обычно магнит прикладывается к стенке пробирки, содержащей образец, чтобы частицы агрегировали к стенке, а остаток образца можно было убрать. Таким способом можно отделять компоненты клеточного лизата, которые ингибируют ДНК–полимеразу и ПЦР. При этом можно выделять как ДНК, так и РНК с высоким выходом продукта из образцов, содержащих значительное количество примесей.

В целом сорбентные методы обеспечивают высокую степень очистки нуклеиновых кислот, но могут быть сопряжены с потерями (особенно в случае низкого содержания в образце – «низкокопийный образец») вследствие необратимой сорбции на носителе или в процессе нескольких промывок. Кроме того, остаточное количество сорбента в конечном растворе ДНК может ингибировать ферментативные реакции ПЦР.

3. Спиртовое осаждение (преципитация) – агрегация НК (как ДНК, так и РНК) в присутствии соли и спирта. После осаждения спиртом НК отделяется от раствора центрифугированием. Осадок, содержащий целевую НК, неоднократно промывается спиртами и концентрируется центрифугированием. На завершающем этапе процедуры происходит растворение НК в водном буфере, часто в процессе нагревания до 55–65°C для лучшего растворения осадка.

Преимуществом данной технологии является возможность работы со «сложными» образцами, выделять в равной степени как ДНК, так и РНК, однако спиртовое осаждение приводит к преципитации не только НК, но и белков, что в свою очередь затрудняет получение чистого препарата. Наиболее простым путем решения проблемы с нежелательными примесями является уменьшение объема анализируемого образца, однако такой подход неприменим, если необходимо получить результат с максимальной чувствительностью.

Для обеспечения качества процесса выделения важно учитывать не только «сложность» материала для исследования и, исходя из этого, подби-

рать наиболее эффективный метод экстракции, но и особенности целевой нуклеиновой кислоты.

ДНК является достаточно стабильным субстратом, медленнее разрушается под действием ДНКаз, лучше сохраняется при транспортировке и хранении образца и допускает применение длительных методик выделения с использованием большой партии образцов. Напротив, РНК – нестабильный продукт, легко деградирует в условиях длительной транспортировки и хранения без дополнительной стабилизации в специальных средах. В условиях неавтоматизированных методик экстракции выделение нестабилизированной РНК лучше проводить небольшими партиями, исходя, например, из емкости имеющихся в ПЦР–лаборатории центрифуг, чтобы избежать деградации РНК в промежутках между этапами отмывок и центрифугирования.

Таким образом, к выбору метода подготовки пробы к ПЦР следует подходить с пониманием целей проведения предполагаемых анализов и особенностей материала для исследования.

Тема: АНАЛИЗ БИОЛОГИЧЕСКИХ ИЗОБРАЖЕНИЙ В IMAGEJ

ImageJ – программа с открытым исходным кодом для анализа и обработки изображений. Написана на языке Java сотрудниками National Institutes of Health и распространяется без лицензионных ограничений как общественное достояние. Открытый API позволяет гибко наращивать функциональность за счёт подключаемых плагинов, а встроенный макроязык – автоматизировать сложные повторяющиеся действия. ImageJ широко применяется в биомедицинских исследованиях, астрономии, географии и других дисциплинах, связанных с анализом изображений, в качестве альтернативы проприетарному ПО.

Плагины сторонних разработчиков охватывают широкий круг задач анализа и обработки изображений: позволяют проводить трёхмерную визуализацию в диапазоне от клеток до рентгенологических изображений, автоматические сравнения вплоть до создания автоматизированных систем изучения, например, в гематологии. Архитектура плагинов ImageJ и встроенная в программу система разработки делает эту платформу весьма популярной для работы и преподавания анализа и обработки изображений.

Пользоваться ImageJ можно через онлайн-апплет или загрузив приложение. Исходный код ImageJ находится в свободном доступе.

ImageJ позволяет отображать, редактировать, анализировать, обрабатывать, сохранять и печатать 8-битные, 16-битные и 32-битные изображения. Программа может читать многие форматы изображений, в частности, TIFF, PNG, GIF, JPEG, BMP, DICOM, FITS, а также форматы необработанных (англ. raw) данных. ImageJ поддерживает стеки – серии изображений, объединённых в одном окне, а многопоточные трудоёмкие операции могут выполняться на многопроцессорных системах в параллельном режиме. В ImageJ можно вычислять площади и статистические показатели пиксельных значений областей изображения, выделяемых вручную или при помощи пороговых функций, измерять расстояния и углы, строить гистограммы плотности и рисовать профили линий. ImageJ поддерживает базовые функции обработки изображений, например, логические и арифметические операции между изображениями, манипуляции с контрастностью, свертки, фурье-анализ, повышение резкости, сглаживание, обнаружение границ и медианный фильтр. Программа позволяет выполнять геометрические преобразования: масштабирование, поворот, отражение и т.д. Количество одновременно используемых изображений ограничивается только объёмом доступной памяти.

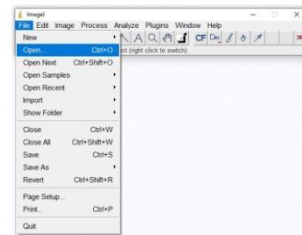
Краткая инструкция по измерению длины в программе ImageJ

Подготовила Жарикова А.О.
Аспирант кафедры ихтиологии и рыбоводства

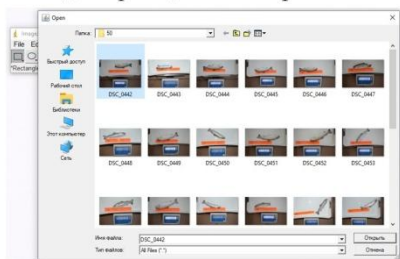
1. Открываем программу ImageJ



2. В строке задач выбираем "File" и из выветившегося списка "Open"



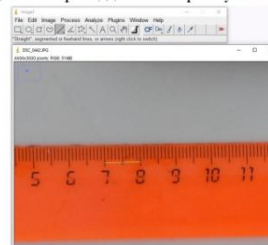
3. Выбираем нужную нам фотографию для проведения измерений



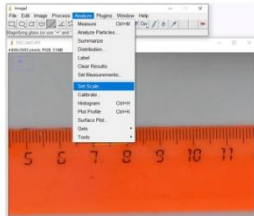
4. Появляется новое окно с выбранной нами фотографией



5. Выбираем в панели инструментов линейку и делаем замер какого-либо постороннего предмета на фото, длина которого уже известна



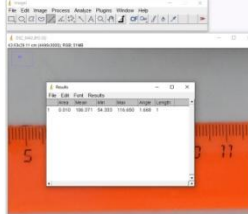
6. В меню задач выбираем "Analyze" и из выветившегося списка "Set Scale"



7. Появляется окно изменения значений (правки). В окнеправки задаём известные нам значения и единицу их измерения, так же ставим галочку на значку "Global" и нажимаем "OK"



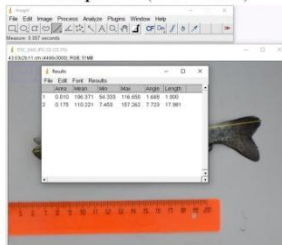
8. На клавиатуре нажимаем кнопку "M" (английскую), высветивается окно с заданным нами расстоянием (1 cm)



9. Делаем замер рыбы и нажимаем кнопку "M"



10. Высветивается окно с результатом измерений (17.981 cm)



Далее по аналогии проводим все необходимые измерения

Тема: АНАЛИЗ БИОЛОГИЧЕСКИХ ИЗОБРАЖЕНИЙ В MMC SPERM И MMC MULTIMETER

MMC Sperm – ПО для автоматизации получения спермограмм.

MMC Sperm – это автоматизированное программное обеспечение для анализа качества спермы в соответствии с параметрами, рекомендованными ВОЗ. Данный программный продукт является специализированной версией ПО MultiMedia Catalog с добавлением методик для анализа спермы.

Основные возможности:

- **Захват изображений и видеоклипов** в формате AVI с устройства ввода изображения.
- Автоматическая **настройка цифровой камеры** для улучшения качества измерений.
- **Хранение данных, изображений и видеоклипов** во встроенной базе данных MultiMedia Catalog.
- Инструмент для **быстрого заполнения полей готовыми блоками текста:** номенклатура, препараты, развернутые шаблоны рекомендаций пациентам.
- **Автоматический анализ концентрации сперматозоидов, подвижности** на нативных препаратах в соответствии с рекомендациями ВОЗ.
- Автоматизированный **анализ морфологии сперматозоидов** на препаратах, окрашенных по методу Diff–Quick в соответствии со строгими критериями Крюгера.
- Анализ **жизнеспособности** сперматозоидов, анализ **фрагментации ДНК**.
- Вывод **статистики** по всем параметрам подвижности и морфологии (в базу и/или на печать).
- Ручная оценка **концентрации лейкоцитов, клеток сперматогенеза, круглых клеток**.
- Возможность проводить **ручные измерения** для решения индивидуальных задач.
- Инструмент для **автоматической постановки диагноза**, основанный на рекомендованных значениях нормы с возможностью добавления и корректировки любых параметров.

Возможности базы данных:

· **Максимальный объем.** Для хранения информации база использует файловую систему компьютера, что позволяет физически хранить в записи и просматривать не только изображения, но и видео, а также любые сопровождающие документы и файлы сторонних программ (не создающих папок для хранения своих проектов). Размер базы ограничен только возможностями жесткого диска ПК или любого другого носителя (переносной жесткий диск, флэшкарта и т.д.).

· **Безопасность.** База представляет собой дерево папок, содержащих технические файлы записей, изображения, видео, файлы сторонних программ. При заражении компьютера вирусом или физическом повреждении жесткого диска выше вероятность сохранения информации, поскольку она находится не в одном файле, как в традиционных базах: при повреждении вирусом могут пропасть только отдельные записи, но, ни в коем случае, не вся база.

· **Двухуровневая система защиты от случайного удаления записи:** запись попадает в корзину, и только оттуда удаляется.

· Инструмент для **архивирования** базы.

· Записи защищены от случайного редактирования: необходимо снять блокировку перед началом редактирования каждой записи.

· Изображения, видео, документы из записей удаляются в **корзину** Windows.

· Имеется **режим ПИН-кода**, позволяющий защитить важные настройки от случайного редактирования неавторизованным персоналом: структура базы (добавление–удаление полей), калибровки, сохраненные фильтры, шаблоны печати.

· **Возможности экспорта.** База написана в формате XML Unicode, что позволяет получать данные из любых полей и экспортировать их в любые другие базы (требуется участие разработчика сторонней базы).

· База имеет **табличный режим** с возможностью выбора отображаемых полей и фильтрации записей по любому набору параметров. Из табличного режима данные можно экспортировать в любые приложения через буфер обмена Windows.

· Записи, **выбранные по результатам фильтрации**, можно экспортировать в отдельную базу и отправлять сторонним пользователям. Любой пользователь Windows XP, 7, 8 может просмотреть экспортированную базу при помощи демо–версии ММС.

· Визуальное **редактирование структуры** базы: добавление/удаление полей, изменение расположения и размеров для отображения на экране ПК.

· **Неограниченное** количество полей в записи. • Типы полей: текстовые (свойства – выпадающий список, многострочное), числовые, поля даты (с календарем для выбора даты).

· Возможность **перемещения** изображений, видео, документов между записями.

· **Быстрый поиск** записи по первым буквами слова в поле.

· **Поиск файлов:** визуальный и по названиям.

· Визуальный инструмент для **фильтрации** записей с любым набором параметров.

· Инструмент для быстрой вставки **готовых блоков текста** в любое поле позволяет быстро создавать заполнять записи любой сложной структуры и распечатывать документы в соответствии с любыми принятыми стандартами.

- **Автоматический диагноз.** Вставка готовых блоков текста в любые поля при выполнении условий фильтрации (например, сравнение результатов со значениями нормы и вставка диагноза, соответствующего комментария для пациента). Вставка любого количества данных в любые поля происходит по нажатию одной кнопки.

- **Табличный режим** отображения данных с возможностью выбора демонстрируемых полей и отбора записей по результатам фильтра. Используется для автоматического составления списков данных, статистического анализа, определения динамики изменений параметров и т.п. Данные могут экспортироваться в другие приложения в виде таблицы через буфер обмена Windows.

- Возможность создания **неограниченного количества баз**, например, для хранения цифровых атласов изображений.

Захват изображений и видео

- Захват изображений и видео с любых устройств по протоколам **TWAIN** (фотоаппараты, сканеры и т.д.), **DirectShow** (цифровые видеокамеры, веб-камеры).

- **Прямые драйверы** для наших цифровых камер. Камера позволяет записывать все настройки изображения, сделанные пользователем для оптимальной работы по всем методикам. Изображения и видео анализируется непосредственно из памяти ПК без записи на диск (при необходимости запись происходит после анализа по нажатию отдельной кнопки, возможно использование кодеков для уменьшения размера файла). Это ускоряет процесс анализа, повышает надежность записи при большой частоте кадров.

Подвижность:

- Точная оценка концентрации сперматозоидов и анализ их подвижности производятся на видеоклипах в формате AVI с высокой частотой кадров (60 к/с).

- Алгоритм анализа построен с учетом требований руководства ВОЗ WHO laboratory manual for the examination and processing of human semen (5–е издание 2010)

Измеряются следующие параметры:

- VCL = криволинейная скорость (микрон/сек). Усредненная по времени скорость движения сперматозоида вдоль его реальной траектории, как она воспринимается в двухмерном пространстве под микроскопом.

- VSL = прямолинейная скорость (микрон/сек). Усредненная по времени скорость движения сперматозоида вдоль линии, проведенной между начальной и конечной точкой траектории.

- VAP = средняя скорость по траектории (микрон/сек). Усредненная по времени скорость движения сперматозоида по усредненной траектории. • LIN = линейность. Линейность реальной траектории.

- STR прямолинейность. Линейность средней траектории.

- BCF = частота биения головки (биений/сек). Средняя частота, с которой реальная траектория сперматозоида пересекает усредненную траекторию.

- ALH = амплитуда бокового смещения головки. Отклонение головки относительно средней траектории.

- WOB = колебание. Величина, описывающая колебание реальной траектории относительно усредненной, VAR/VCL.

- Удлиненность головки сперматозоида

- По всем параметрам ведется статистика

- Основываясь на указанных выше параметрах, сперматозоиды разделяются на классы подвижности А = быстрое прямолинейное движение, В = медленное или замедленное прямолинейное движение, С = непрямолинейное движение, D = неподвижность. А+В = прогрессивно подвижные, А+В+С = общий процент подвижных.

- Анализ подвижности происходит в интерактивном режиме – каждый клип можно просмотреть заново, изменить настройки выделения, удалить объекты. При наведении курсора на сперматозоид появляется список измеренных параметров.

- Программа может работать как в светлом поле, так и с фазовым контрастом. Рекомендуется негативный фазовый контраст.

Анализ морфологии

- Программа настроена для анализа изображений препаратов, окрашенных по методу Diff–Quik, в соответствии со строгими критериями Крюгера.

- Измеряемые параметры:

- Площадь головки

- FFC = form factor circle Фактор формы, круг. Степень схожести головки с кругом.

- Периметр головки.

- Яркость.

- ELL_B = Большая ось эллипса, описывающего головку, т.е. длина головки сперматозоида.

- ELL_S = Малая ось эллипса, описывающего головку, т.е. ширина головки сперматозоида.

- Elnг = удлиненность головки сперматозоида.

- FFE = form factor ellipse Фактор формы, эллипс. Степень схожести головки с эллипсом.

- Акросома = Процент, занимаемый областью акросомы.

- По всем параметрам ведется статистика

- Программа разделяет сперматозоиды на классы Норма и Патология головки, основываясь на параметрах головки. Нажатием правой кнопки мыши Вы можете произвести корректировку результата, а также указать прочие отклонения (патология хвоста, шейки).

· В случае невозможности получения качественного изображения для автоматического анализа (например, из-за неправильной пробоподготовки), можно воспользоваться специальным инструментом для ручного нанесения объектов.

· Расчет индекса тератозооспермии (TZI).

Жизнеспособность сперматозоидов

• Программа позволяет проводить тест на жизнеспособность сперматозоидов (Vitality Test, суправитальное окрашивание). Тест на жизнеспособность сперматозоидов имеет важное клиническое значение и выполняется при наличии в эякуляте менее 40% подвижных сперматозоидов (A+B+C).

• Наличие большого количества живых, но неподвижных сперматозоидов может свидетельствовать о структурных нарушениях в развитии хвоста сперматозоида. Большое количество неподвижных и мертвых сперматозоидов (некрозооспермия) может являться показателем эпидидимальной патологии.

Фрагментация ДНК сперматозоидов

• Тест на степень фрагментации ДНК сперматозоидов на основе метода дисперсии хроматина предоставляет дополнительную информацию о потенциале фертильности образца спермы, которую невозможно получить путем стандартных.

• Программа позволяет автоматически выделить на изображении сперматозоиды и их ореолы, а также рассчитать процентное соотношение сперматозоидов с фрагментированной ДНК и нормальных сперматозоидов. Методика работает с использованием светлполюсного объектива 40х.

Расчёт количества доз

• По окончании анализа качества семени программа автоматически рассчитает количество доз спермы заданного объёма и качества, а также количество разбавителя, который необходимо добавить к исследуемому образцу спермы для получения такого количества доз.

Отчеты

• Результаты анализа (сермограмму) можно распечатать на основе пользовательских RTF (reach text format) шаблонов.

• Спермограмма заполняется автоматически в соответствии с установками, заданными пользователем в базе данных. Доступны следующие возможности: группировка данных, изменения порядка отображения, отключаемый вывод полей базы (поля для служебного пользования), изображений и т.д. Шаблон спермограммы можно изменять при помощи любого текстового редактора, поддерживающего формат RTF. Если у Вас возникнут особые пожелания, мы поможем Вам настроить печать спермограммы.

• Кроме спермограммы программа может быть настроена для вывода на печать любой сопутствующей документации: заполненных договоров об

обслуживании пациента, рецептов, любой внутренней отчетной документации.

MMC Multimeter – программа для хранения, обработки и анализа изображений и видео.

Основные возможности базы данных:

- хранение произвольного количества изображений, фотографий, видеофайлов и документов в одной записи
- хранение неограниченного количества текстовой и цифровой информации в записи
- развитые средства импорта изображений из цифровой камеры и из каталогов
- автоматическое разделение всех импортируемых изображений на отдельные записи по сериям
- быстрый поиск записи по любому текстовому полю, по фамилии пациента достаточно ввести 1–3 первые буквы
- визуальное формирование фильтров с наборами критериев для поиска по нескольким условиям
- оперативное переключение различных фильтров
- удобные средства просмотра
- инструмент для быстрого заполнения полей готовыми блоками текста
- линейные и угловые измерения на фото и видео, измерения кругов: радиус, диаметр, площадь и объем шара, счетчик
- легкая модификация набора полей базы в визуальном режиме формирования бланка
- хранение в записи файлов любых типов, *.doc, *.xls и т.д.
- возможность легко изменять и обрабатывать изображения в других программах, продолжая хранить их в базе данных
- настраиваемый отчет для вывода данных на печать, возможность изменения шаблонов печати для вывода данных в различных формах
- возможность использования одной базы изображений в сети несколькими пользователями
- ввод изображений с любых камер, сканеров и других устройств, поддерживающих TWAIN или DirectShow протоколы
- Комплекты камера+ПО: подберем профессиональную цифровую USB камеру нашей разработки с управлением из программы (область интереса, автоподстройка баланса белого и усиления) под Вашу задачу.

Параметры анализатора изображений:

- сегментация изображений и видео по яркости и цвету
- удобный редактор для нанесения и редактирование объектов
- морфологические операции с масками – эрозия, дилатация, открытие, закрытие и т.п.
- измерение 20ти параметров: размеров, формы и оптических характеристик
- вывод индивидуальных данных для любого измеренного объекта

- автоматическая классификация по классам, заданным вручную, или автоматически по параметру
 - обучение классификатора по конкретным объектам
 - статистическая обработка и накопление результатов измерений
 - обработка серии изображений по алгоритму
 - формирование нескольких вариантов диаграмм распределения по классам, параметру и др.
- вывод на диаграмме статистической и дополнительной информации, вывод таблицы распределения по классам, количество, процент количества, процент площади для каждого класса
 - построение графиков зависимости между параметрами и изучение динамических процессов
 - фазовый анализ
 - анализ видеофайлов
 - подключение внешних программ для обработки изображений, например для получения резких изображений, из серии снимков разных уровней
 - сохранение результатов измерений в базе данных
 - сохранение диаграммы в виде изображения в базе данных
 - передача результатов измерений в Excel, Word и др. программы
 - вывод данных из базы данных и результатов статистики на печать по различным вариантам бланков.

Тема: **ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ПРОГРАММНОЙ СРЕДЫ R ПРИ СТАТИСТИЧЕСКОМ АНАЛИЗЕ**

R – это среда для статистических расчетов. R задумывался как свободный аналог среды S-Plus, которая, в свою очередь, является коммерческой реализацией языка расчетов S. Язык S – довольно старая разработка. Он возник еще в 1976 году в компании Bell Labs и был назван, естественно, «по мотивам» языка C. Первая реализация S была написана на FORTRAN и работала под управлением операционной системы GCOS. В 1980 г. реализация была переписана под UNIX, и с этого момента S стал распространяться в основном в научной среде. Начиная с третьей версии (1988 г.), коммерческая реализация S называется S-Plus. Последняя распространялась компанией Insightful, а сейчас распространяется компанией TIBCO Software. Версии S-Plus доступны под Windows и различные версии UNIX – естественно, за плату, причем весьма и весьма немаленькую (версия для UNIX стоит порядка \$6500). Собственно, высокая цена и сдерживала широкое распространение этого во многих отношениях замечательного продукта. Тут-то и начинается история R.

В августе 1993 г. двое молодых новозеландских ученых анонсировали свою новую разработку, которую они называли R (буква «R» была выбрана просто потому, что она стоит перед «S», тут есть аналогия с языком программирования C, которому предшествовал язык B). По замыслу создателей (это были Robert Gentleman и Ross Ihaka), это должна была быть новая реализация языка S, отличающаяся от S-Plus некоторыми деталями, например обращением с глобальными и локальными переменными, а также работой с памятью. Фактически они создали не аналог S-Plus, а новую «ветку» на «дереве S» (многие вещи, которые отличают R от S-Plus, связаны с влиянием языка Scheme). Проект вначале развивался довольно медленно, но когда в нем появилось достаточно возможностей, в том числе уникальная по легкости система написания дополнений (пакетов), все большее количество людей стало переходить на R с S-Plus. Когда же, наконец, были устранены свойственные первым версиям проблемы работы с памятью, на R стали переходить и «любители» других статистических пакетов (прежде всего тех, которые имеют интерфейс командной строки: SAS, Stata, SYSTAT). Количество книг, написанных про R, за последние годы выросло в несколько раз, а количество пакетов уже приближается к трем с половиной тысячам!

Коротко говоря, R применяется везде, где нужна работа с данными. Это не только статистика в узком смысле слова, но и «первичный» анализ (графики, таблицы сопряженности) и продвинутое математическое моделирование. В принципе, R может использоваться и там, где в настоящее время принято использовать специализированные программы математического анализа, такие как MATLAB или Octave. Но, разумеется, более всего его применяют для статистического анализа от вычисления средних величин до вейвлет-преобразований и временных рядов. Географически R распространен тоже очень широко. Трудно найти американский или западноевропейский универ-

ситет, где бы не работали с R. Очень многие серьезные компании (скажем, Boeing) устанавливают R для работы.

У R два главных преимущества: невероятная гибкость и свободный код. Гибкость позволяет создавать приложения (пакеты) практически на любой случай жизни. Нет, кажется, ни одного метода современного статистического анализа, который бы не был сейчас представлен в R. Свободный код – это не просто бесплатность программы (хотя в сравнении с коммерческими пакетами, продающимися за совершенно безумные деньги, это, конечно, преимущество, да еще какое!), но и возможность разобраться, как именно происходит анализ, а если в коде встретилась ошибка – самостоятельно исправить ее и сделать исправление доступным для всех.

У R есть и немало недостатков. Самый главный из них – это трудность обучения программе. Команд много, вводить их надо вручную, запомнить все трудно, а привычной системы меню нет. Поэтому порой очень трудно найти, как именно сделать какой-нибудь анализ. Если функция известна, то узнать, что она делает, очень легко, обычно достаточно набрать команду `help(название функции)`. Увидеть код функции тоже легко, для этого надо просто набрать ее название без скобок или (лучше) ввести команду `getAnywhere(название функции)`. А вот что делать, если «задали» провести, скажем, дисперсионный анализ, а функция неизвестна?

Не стоит забывать, однако, что сила R – там же, где его слабость. Интерфейс командной строки позволяет делать такие вещи, которых рядовой пользователь других статистических программ может достичь только часами ручного труда. Вот, например, простая задача: требуется превратить выборку, состоящую из цифр от 1 до 9, в таблицу из трех колонок (допустим, это были данные за три дня, и каждый день делалось три измерения). Чтобы сделать это в программе с визуальным интерфейсом, скажем в STATISTICA, требуется: (1) учредить две новые переменные, (2–3) скопировать дважды кусок выборки в буфер, (4–5) скопировать его в одну и другую переменную и (6) уничтожить лишние строки. В R это делается одной командой:

```
> b <- matrix(1:9, ncol=3)
```

Второй недостаток R – относительная медлительность. Некоторые функции, особенно использующие циклы, и виды объектов, особенно списки и таблицы данных, «работают» в десятки раз медленнее, чем их аналоги в коммерческих пакетах. Но этот недостаток преодолевается, хотя и медленно. Новые версии R «умеют» делать параллельные вычисления, создаются оптимизированные варианты подпрограмм, работающие много быстрее, память в R используется все эффективнее, а вместо циклов рекомендуется применять векторизованные вычисления.

R обладает примечательными характеристиками, которые делают его привлекательным для использования. Он может работать с различными парадигмами программирования, но лучше всего проявляет себя в объектно-ориентированном программировании. В R функции и таблицы представляют

собой объекты, которые могут взаимодействовать друг с другом. Благодаря этому, создание сложных распределённых программ становится возможным, а повторное использование функций и объектов становится удобным и эффективным.

Язык R интерпретируемый, что означает, что программа, написанная на нём, готова к исполнению сразу же, без необходимости компиляции в исполняемый файл. Также, в процессе написания кода можно проверять его работу по частям, что гарантирует более удобную отладку.

Синтаксис R прост и понятен. В его основе отсутствуют сложные конструкции и запутанные функции. Язык имеет всего четыре типа данных: символьные, числовые, логические и комплексные. Однако, эти простые типы и функции языка R могут быть организованы в сложные структуры и конструкции данных. Подобно строительным блокам LEGO, которые сами по себе просты, но при совместном использовании могут составить как игрушечную машинку, так и боевой вертолёт.

Язык R обладает удобными интерактивными инструментами. Например, есть среда разработки RStudio, которая обеспечивает подсветку синтаксиса, навигацию по тексту программы, сортировку таблиц и отображение графиков в отдельном окне. Кроме того, существует приложение–блокнот Jupyter Notebook, позволяющее создавать и обмениваться программами на R прямо в веб-браузере. Не следует забывать и о дистрибутиве Anaconda, который включает в себя широкий набор популярных библиотек, упрощая работу с языком R.

Существует огромное количество библиотек и расширений, доступных для использования. Они предоставляют готовые функции для обработки и визуализации данных, проведения быстрых статистических операций, распознавания текстов, проведения A/B-тестирования и обслуживания различных областей науки.

Язык R предоставляет множество возможностей для обработки данных и проведения анализа. В отличие от классических сервисов с графическим интерфейсом, R чаще используется для написания программного кода, который выполняет определенные задачи и выводит результаты или графики. Давайте рассмотрим некоторые из основных возможностей языка R.

Первая возможность – очистка и обработка данных. Например, вы можете написать программу на R, которая сгруппирует данные о покупках по товарам, удалит дубликаты и подготовит таблицу для дальнейшего анализа. Это очень полезно, когда у вас есть большой массив информации, который требует предварительной обработки.

Вторая возможность – проведение статистических тестов. С помощью R вы можете вычислить среднюю продолжительность и определить, есть ли статистически значимая разница между несколькими показателями. Это помогает в проведении анализа данных и выявлении взаимосвязей.

Третья возможность – объединение данных из разных таблиц. R позволяет объединять таблицы разных форматов и работать с ними как с единым

файлом. Это удобно, когда вам нужно объединить данные из разных источников для проведения комплексного анализа.

Четвертая возможность – создание интерактивных графиков. R предоставляет широкие возможности для визуализации данных. Вы можете распределить данные на графике, настроить параметры и создать интерактивные графические элементы, которые позволят вам взаимодействовать с данными.

Пятая возможность – анализ регрессионных моделей. R позволяет выявлять отношения между переменными и строить регрессионные модели. Например, вы можете исследовать, как доход магазина зависит от различных факторов, таких как цена товаров, рекламный бюджет и т.д.

Шестая возможность – выполнение других математических операций. R позволяет объединять многомерные массивы, прогнозировать значения и даже распознавать текст. Для большинства задач уже существуют готовые библиотеки, но вы также можете написать свой собственный код, используя широкий математический инструментарий, доступный в R.

Язык R предоставляет множество возможностей для обработки данных и проведения анализа. Он позволяет очищать и обрабатывать данные, проводить статистические тесты, объединять таблицы, создавать интерактивные графики, анализировать регрессионные модели и выполнять другие математические операции. Это мощный инструмент для работы с данными и исследования их характеристик.

В R существуют два отличных пакета для работы с данными – `dplyr` и `data.table`. Каждый из них имеет свои сильные стороны. `Dplyr` более элегантен и напоминает естественный язык, в то время как `data.table` является более лаконичным и позволяет выполнять множество операций в одной строке. Кроме того, в некоторых случаях `data.table` демонстрирует более высокую скорость выполнения, что может быть решающим фактором при наличии ограничений на память или производительность.

`Dplyr` предоставляет пять основных функций для работы с данными. Функция `select` используется для выбора одного или нескольких столбцов. Функция `filter` позволяет выбрать строки на основе заданных критериев. Функция `arrange` служит для сортировки данных по одному или нескольким столбцам в порядке возрастания или убывания. Функция `mutate` используется для добавления новых столбцов к данным. А функция `summarise` позволяет суммировать часть данных.

`Data.table` использует компактный формат `dt[i, j, by]`, который можно интерпретировать следующим образом: возьмите таблицу `dt`, выберите строки, используя условие `i`, и произведите вычисления, указанные в операторе `j`, сгруппировав данные по условию `by`.

Теперь перейдем к `ggplot2`. Можно считать, что у библиотеки `ggplot2` есть своя философия, поняв которую, строить графики гораздо легче.

Во-первых, графики `ggplot` многослойные, то есть строятся они поэтапно, по слоям. Сначала указывается датафрейм, с которым мы работаем, и интересующие нас показатели (первый слой), затем указывается тип графика

(второй слой), затем настройки для подписей, легенды и прочее (остальные слои). Все слои добавляются через +.

Во-вторых, для любого графика указывается функция `aes`, сокращенно от `aesthetics`, в качестве аргументов которой задаются переменные интереса (которые хотим отобразить на графике), а также элементы оформления графика, которое непосредственно связано с переменными в датафрейме.

Программная среда R является бесплатной альтернативой современным платным статистическим программам. Сегодня R является безусловным лидером среди свободно распространяемых систем статистического анализа, о чем свидетельствует, например, тот факт, что в 2010 г. система R стала победителем ежегодного конкурса открытых программных продуктов *Bossie Awards* в нескольких номинациях. Ведущие университеты мира, аналитики крупнейших компаний и исследовательских центров постоянно используют R при проведении научно-технических расчетов и создании крупных информационных проектов.

Данное учебно-методическое пособие представляет собой руководство по работе в программе R с использованием пакета R Commander – одного из сотни статистических пакетов R, а также с использованием некоторых других пакетов. В данном издании описываются минимальные базовые статистические методики для обработки биологической информации. Руководство не включает в себя такие классические методы, как критерий хи-квадрат, многофакторный дисперсионный анализ, корреляционные и регрессионные методы и множество других.

Ознакомиться более подробно с основами работы в программе R, изложенными в электронной книге С. Э. Мастицкого, В. К. Шитикова «Статистический анализ и визуализация данных с помощью R» (2014). Адрес доступа: <http://r-analytics.blogspot.com>.

Ознакомиться с книгой Г. Джеймса, Д. Уиттона, Т. Хасти, Р. Тибширани «Введение в статистическое обучение с примерами на языке R» (2016). Адрес доступа: <http://dmkpress.com/catalog/computer/statistics/978-5-97060-293-5/>.

Важно! При написании научных статей обязательно приводите сведения о том, какой тест и для каких целей вы использовали в своих исследованиях. Фразы «В исследованиях нами использовались стандартные статистические методы» или «Статистическая обработка проводилась по общепринятой методике и в программе «X» недопустимы, так как стандартных статистических методов не существует, а описанные в данном пособии методы отражают только один из сотен подходов в обработке статистической информации. Игнорирование этого положения дает основание специалисту, при прочтении ваших работ, сомневаться во владении автором методами статистической обработки, а также в достоверности полученных данных.

<https://elib.baa.by/xmlui/bitstream/handle/123456789/3597/ecd5605.pdf?sequence=1&isAllowed=y> (Фундаментальные и прикладные научные исследования в аквакультуре : учебно-методическое пособие. В 3 ч. Ч. 1. Ис-

пользование программной среды R при статистическом анализе / Н. В. Барулин, К. Л. Шумский. – Горки : БГСХА, 2022. – 102 с.)